ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

SKRIPSI

IDENTIFIKASI PROTEIN ANTIGENIK LARVA INSTAR III LALAT RUMAH (*Musca domestica*) DENGAN UJI *DOT BLOT*

Oleh :

BENNY APRISSA S.P.
MALANG – JAWA TIMUR

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2006

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

IDENTIFIKASI PROTEIN ANTIGENIK LARVA INSTAR III LALAT RUMAH (*Musca domestica*) DENGAN UJI *DOT BLOT*

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

BENNY APRISSA S.P.

060112920

Menyetujui,

Komisi Pembimbing

Benyamin C. Tehupuring, M.Si., Drh.

Pembimbing Pertama

Dr. Hardijanto, M.S., Drh.

Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN.

Menyetujui

Ketua Penguji,

Yola Rahmahani, M.Kes., Drh.
Ketua

Prof. Dr. H. Rochiman Sasmita, M.S., Drh
Sekretaris

Poedji Hastutiek, M.Si., Drh.
Anggota

Benyamin Chistofel Tehupuring, M.Si., Drh.
Anggota

Dr. Hardijanto, M.S., Drh.
Anggota

Surabaya, 19 Juni 2006
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,

Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh.
NIP. 130 687 297

PROFIL PROTEIN ANTIGENIK LARVA INSTAR III LALAT RUMAH (*Musca domestica*) DENGAN UJI *DOT BLOT*

BENNY APRISSA S.P

ABSTRAK

Protein antigenik larva lalat *M. domestica* adalah merupakan protein yang terdapat pada larva lalat *M. domestica* yang diduga bersifat antigenik yang dapat menimbulkan respon imun jika diinjeksikan pada tubuh inang atau hewan coba. Dalam penelitian ini dilakukan identifikasi terhadap protein larva lalat *M. domestica* dengan uji *dot blot* untuk mengetahui apakah protein tersebut dapat dimanfaatkan dalam upaya pengendalian penyakit *myiasis* melalui vaksinasi inang.

Penelitian ini bertujuan untuk Mengidentifikasi apakah *whole* protein larva instar III lalat *M. domestica* bersifat antigenik melaui uji *dot blot*.

Uji *dot blot* ini dilakukan dengan mereaksikan protein larva sebagai antigen dengan antibodi yang berasal dari hewan coba kelinci kemudian ditambahkan dengan Ab sekunder konjugat AP (Alkaline Phospatase) dan diinkubasikan dengan *western blue substrat* dan digoyang hingga terlihat warna dan reaksi dihentikan dengan memindahkan hasil *dot blot* ke dalam aquadest.

Hasil penelitian ini menunjukkan hasil positif secara keseluruhan. Antigen dari protein larva *M. domestica* dapat diikat oleh antibodi dari serum kelinci. Hal tersebut telihat dari noktah-noktah atau dot yang timbul pada kertas membran nitroselulose. Hasil dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa protein larva *M. domestica* adalah protein yang bersifat antigenik dan kemungkinan dapat dipakai sebagai bahan dalam pembuatan vaksin *myiasis*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas berkah rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulisan skripsi dengan judul **"Identifikasi Protein Antigenik Larva Instar III Lalat Rumah (*M. domestica*) Dengan Uji *Dot Blot*"**, dapat terselesaikan dengan baik. Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Penulisan makalah skripsi ini tidak terlepas dari bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh.. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Unair yang telah memberikan kesempatan serta ijin melakukan penelitian di Fakultas Kedokteran Hewan Unair.
2. Bapak Benyamin Christofel Tehupuring, M.Si.,Drh. selaku Dosen Pembimbing Pertama yang senantiasa memberikan saran dan masukan.
3. Bapak Dr. Hardijanto, M.S.,Drh. selaku Dosen Pembimbing Kedua
4. Ibu Poedji Hastutiek, M.Si.,Drh. selaku Ketua Penelitian dan Penguji Skripsi serta Bapak Mufasirin, M.Si.,Drh. yang turut membantu dalam pelaksanaan penelitian.
5. Bapak Prof. Dr. Rochiman Sasmita, M.S.,Drh. Selaku Kepala bagian Parasitologi FKH Unair serta Penguji Skripsi.
6. Ibu Yola Rahmahani, M.Kes., Drh. selaku Ketua Penguji Skripsi.

7. Bapak Djoko Legowo, M.kes., Drh. yang sering memberikan motivasi.
8. Papa, Mama, Mas Andi, adikku Wenny dan Regina yang selalu memberikan motivasi dan dorongan baik secara materiil dan spirituil khusus buat adikku Bitya Ariantini, Dian K.
9. Seluruh keluarga besarku, temanku Dian, Andy dan keluarga
10. Teman-teman angkatan 2001, Candra, Fithrotun, A. Nadif, seluruh transferan 99, Deddy, Doel, Pipit, Taufik, Dian, Yuan, Ladu dan Seluruh Karmen Crew, Ikwan, Teguh, GMC Production crew serta semua pihak yang turut membantu penulisan skripsi ini baik secara langsung maupun tidak langsung.

Besar harapan penulis skripsi ini dapat bermanfaat di kemudian hari sebagai acuan dan memperkaya khasanah pengetahuan serta sumber informasi yang berguna bagi penelitian lebih lanjut, sehingga ilmu pengetahuan dapat berkembang lebih maju khususnya di bidang veteriner dan umumnya bagi kesejahteraan manusia melalui pengembangan ilmu pengetahuan di bidang medikasi dan kesehatan.

Akhir kata penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran dari semua pihak agar penulisan skripsi ini dapat menjadi lebih baik dan lebih sempurna serta bermanfaat di masa mendatang.

Surabaya, Maret 2006

Penulis,

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL..... i

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN..... ii

ABSTRAK.....iv

UCAPAN TERIMA KASIH.....v

DAFTAR ISI.....vii

DAFTAR TABEL..... x

DAFTAR GAMBAR.....xi

DAFTAR LAMPIRAN..... xii

BAB I. PENDAHULUAN.....1

1.1 Latar belakang.....1

1.2 Rumusan Masalah.....4

1.3 Tujuan Penelitian..... 4

1.4 Manfaat Penelitian.....4

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA 5

2.1 Tinjauan Larva dan Lalat *M. domestica*..... 5

2.1.1 Taksonomi..... 5

2.1.2 Etiologi..... 5

2.1.3 Siklus Hidup..... 8

2.1.4 Kejadian *Myiasis*..... 11

2.1.5 Pengendalian *Myiasis*.....13

2.2 Protein 15

2.3 Antigen..... 18

2.4 Antibodi..... 19

2.5 Immunitas Terhadap Parasit 21

2.6 Immunisasi Hewan Coba..... 22

2.7 Metode *Dot Blot*..... 23

BAB III. MATERI DAN METODE..... 25

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian..... 25

3.2 Materi Penelitian..... 25

3.4.1 Unit Analisis..... 25

3.4.2 Bahan dan Alat..... 25

3.3 Metode Penelitian..... 26

3.3.1 *Rearing* Lalat dan Koleksi Larva Instar III Lalat *M.domestica* 27

3.3.2 Isolasi *Whole* Protein Larva Instar III Lalat *M. domestica* 28

3.3.3 Produksi Antibodi Poliklonal pada Kelinci..... 28

3.3.4 Uji *Dot Blot* ***Whole*** Protein Larva Instar III Lalat *M. domestica* 29

BAB IV. HASIL PENELITIAN..... 31

4.1 *Rearing* Lalat dan Koleksi Larva Instar III *M. domestica* 31

4.2 Pengukuran Kadar *Whole* Protein Larva Instar III *M. domestica*.31

4.3 Karakterisasi *Whole* Protein Larva dengan *Dot Blot* 32

BAB V. PEMBAHASAN.....34

5.1 *Rearing* Lalat dan Koleksi Larva Instar III *M. domestica*.....34

5.2 Pengukuran Kadar *Whole* Protein Larva Instar III *M. domestica*.35

5.3 Karakterisasi ***Whole*** Protein Larva dengan *Dot Blot*.....35

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN 38

6.1 Kesimpulan.....38

6.2 Saran..... 38

RINGKASAN.....39

DAFTAR PUSTAKA 41

LAMPIRAN 46

DAFTAR TABEL

Tabel Halaman

1. Hasil Analisis Uji *Dot Blot* Protein Larva Instar III Lalat *M. domestica*..... 32

2. Hasil ELISA Serum Protein Larva *M. domestica* 51

DAFTAR GAMBAR

Gambar **Halaman**

1. Lalat *M. domestica* 5

2. Telur Lalat *M. domestica* (Perbesaran 100x)..... 8

3. Koleksi Pupa Lalat *M. domestica* 9

4. Siklus Hidup Lalat *M. domestica* 11

5. Serangan *Myiasis* Larva Lalat *M. domestica* 12

6. Kandang "*Rearing*" Lalat *M. domestica*.....27

7. Proses Pencucian Membran Nitroselulose pada Uji *Dot Blot*.....30

8. Hasil Koleksi Larva Instar III Lalat *M. domestica*.....31

9. Hasil Uji *Dot Blot* Protein Larva Instar III Lalat *M. domestica* 32

10. Hasil Elektroforesis *Whole* Protein Larva *M. Domestica* dengan SDS-PAGE 12% Pewarnaan Perak Nitrat ($AgNO_3$).....57

11. Pengambilan darah kelinci.....57

12. Proses Running.....57

13. Peralatan (Mikropipet).....57

14. Bahan Uji *Dot Blot*.....57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran Halaman

1. Diagram Alir Metode dan Operasional Penelitian.....46

2. Diagram Alir Uji *Dot Blot Whole* Protein Larva Instar III Lalat *M. domestica*..... 47

3. Cara Kerja (Prosedur) *Dot Blot*. 48

4. Cara Kerja Teknik ELISA (Deteksi Antibodi)..... 50

5. Hasil ELISA Antibodi Poliklonal Protein Larva Instar III Lalat *M. domestica*..... 51

6. Hasil Fraksinasi Protein dengan SDS-PAGE 12%..... 52

7. Cara Kerja (Prosedur) SDS PAGE 12% (*Sodium Deodecyl Sulphonate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)..... 53

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Di masa sekarang ini sektor peternakan sering mendapatkan perhatian masyarakat. Peternakan yang merupakan salah satu penyedia bahan makanan asal hewan sering mendapatkan keluhan atas tertularnya penyakit asal hewan ke manusia. Masyarakat pun juga semakin menyadari akan pentingnya kesehatan oleh karena itu sektor peternakan juga dituntut agar dapat meningkatkan mutu ternak baik kesehatan ternak dan juga cara pengolahan yang baik dan higienis.

Namun berbagai kendala sering dihadapi oleh peternak dalam memelihara ternaknya mulai dari proses perawatan, pemberian pakan, sanitasi dan kesehatan lingkungan, peningkatan kualitas ternak, pencegahan, pengobatan serta pemberantasan penyakit dan lain sebagainya, sering menimbulkan kerugian yang cukup besar. Salah satu kendala yang cukup merepotkan bagi para peternak adalah infestasi parasit, walaupun jarang menimbulkan kematian ternak namun produktivitas ternak menjadi jauh menurun dan tidak sebanding dengan perawatan dan pemeliharaan.

Salah satu kasus infestasi parasit adalah infestasi larva lalat atau biasa disebut *myiasis*. Selain cara pengendaliannya yang sulit juga diperlukan biaya yang cukup mahal dalam pemberantasan parasitnya. Pada sapi misalnya, kejadian *myiasis* ini menjadi penting karena lokasi luka kebanyakan terdapat pada kuku sehingga sapi yang sakit tidak dapat dipekerjakan bahkan harus dijual atau

dipotong. Sapi-sapi impor asal Australia (Brahman dan Brahman Cross) ternyata lebih peka terhadap serangan *myiasis* dibandingkan sapi lokal (Sigit, 1978; Sigit dan Partoutomo, 1981).

Menurut Partoutomo (2000), *Myiasis* merupakan suatu infestasi larva lalat pada jaringan tubuh manusia dan binatang vertebrata, di mana pada periode tertentu hidup pada jaringan hidup, jaringan nekrotik atau jaringan mati pada inang, substansi cairan tubuh. *Myiasis* menurut lokasi kerusakan yang ditimbulkan dibagi atas 3 tipe: *myiasis cutaneus, myiasis body cavity* dan *myiasis accidental*. Sedangkan menurut sifat hidup larvanya dibagi atas *myiasis obligat* dan *myiasis fakultatif*. Serangan *myiasis* menurut datangnya lalat dewasa yang akan meletakkan telur pada inang dibagi atas *myiasis* primer, sekunder dan tersier.

Lalat *M. domestica* termasuk lalat penyebab *myiasis* tersier yang akan memperparah kerusakan yang terjadi pada inang. *Myiasis* yang disebabkan oleh larva lalat *M. domestica* termasuk *myiasis fakultatif*, karena larva lalat ini masih bisa hidup pada tempat di luar tubuh inang. Larva lalat *Musca domestica* juga dapat ditemukan pada kasus *myiasis intestinal* yang terjadi pada manusia (Sehgal *et.al.*, 2002). Luka akibat gigitan caplak *Boophilus microplus* juga mengundang datangnya sejumlah lalat yang hidup di sekitar ternak seperti *M. domestica* sebagai penyebab awal timbulnya *myiasis* (Sigit, 1978). Pada kasus *myiasis* yang ditemukan di Bogor dilaporkan bahwa selain larva lalat obligat yaitu *Chrysomya bezziana* dan *Booponus intonsus* juga ada lalat *Sarcophaga dux* dan *Musca domestica* (Djaenoedin dikutip oleh Partoutomo, 2000).

Beberapa serangga yang menghisap darah, jaringan atau cairan jaringan dari mamalia untuk proses kehidupannya sering sebagai parasit ataupun vektor dari penyakit viral, protozoa dan cacing pada manusia dan hewan ternak serta satwa liar (Harwood dan James, 1979).

Cara-cara yang digunakan untuk mengontrol serangga dalam industri peternakan saat ini semakin diperbaiki karena percepatan dan perkembangan serangga lalat ini cukup luas, sedang insektisida dapat menimbulkan residu bahan kimia terhadap hasil peternakan dan juga dipandang tidak efektif karena lalat penyebab *myiasis* tidak menempel pada tubuh ternak kecuali pada saat meletakkan telur (Partoutomo, 2000). Pengendalian *myiasis* secara biologi dengan melepaskan lalat jantan yang telah disterilkan dengan radiasi telah berhasil dilakukan di Papua New Guinea, namun cara ini dianggap terlalu mahal dan perlu informasi dasar tentang bioekologi lalat (Clarke 1991), sehingga dicarilah alternatif pengendalian yang lain.

Satu pendekatan yang memungkinkan adalah dengan melakukan vaksinasi inang dengan antigen yang berasal dari bagian tubuh serangga sendiri. Larva serangga dianggap stadium serangga yang paling mudah dan memungkinkan untuk dipakai dalam penelitian. Tubuh serangga terdiri atas khitin, proteoglycan dan protein. Pemeriksaan protein larva lalat *M. domestica* digunakan sebagai antigen dalam uji *dot blot*. Hasil pengujian *dot blot* hanya bersifat semikuantitatif yaitu untuk mendeteksi jenis antigen bukan berat molekulnya. Namun demikian estimasi konsentrasi antigen dapat diketahui pada *blots* tersebut (Rantam, 2003).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah antigen dari protein larva *M. domestica* dapat diikat oleh antibodi yang berasal dari serum hewan coba kelinci yang sebelumnya telah disuntik protein larva. Dari ikatan Ag-Ab maka dapat dilihat antigenitas dari protein larva *M. domestica.*

Penerapan hasil penelitian ini diharapkan dapat dipakai sebagai acuan dasar dalam pembuatan bahan vaksin myiasis yang sesuai dan protektif dan dapat dikombinasikan dengan vaksin larva lalat primer dan sekunder sehingga dapat menanggulangi masalah *myiasis* secara optimal.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah dengan uji *dot blot whole* protein larva instar III lalat *M. domestica* menunjukkan sifat antigenik?

1.3 Tujuan Penelitian

Mengidentifikasi apakah *whole* protein larva instar III lalat *M. domestica* bersifat antigenik melaui uji *dot blot.*

1.4 Manfaat penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi ilmiah dalam pengembangan pembuatan vaksin *myiasis* yang protektif sehingga mampu mengurangi kejadian *myiasis* pada ternak.

BAB II

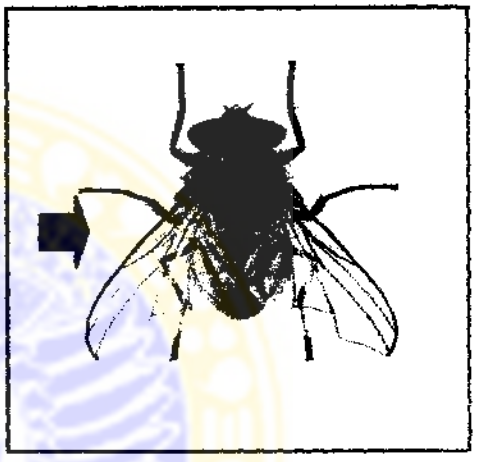
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Larva dan Lalat *M. domestica*

2.1.1 Taksonomi

Phylum	: Arthropoda
Class	: Insecta
Ordo	: Dipthera
Sub Ordo	: Cyclorrhapha
Familia	: Muscidae
Genus	: Musca
Spesies	: *M. domestica*

(Sumber Canyon, 1999)



Gambar 1. Lalat *M. domestica*
Keterangan: Panah hijau (↑)

2.1.2 Etiologi

Soulsby (1986), menyatakan bahwa *Musca domestica* adalah lalat rumah, berukuran sebesar biji kacang tanah, berwarna hitam kekuningan. Lalat jantan berukuran 5,8-6,5 mm panjangnya dan betina 6,5-7,5 mm panjangnya. Tubuh terbagi menjadi tiga bagian yaitu bagian kepala dengan sepasang antena, bagian thorax dengan tiga pasang kaki dan sepasang sayap serta abdomen. Pada vena sayap M1+2 melengkung ke depan ke arah distal dan sel R5 (bagian posterior pertama) hampir menutup. Lalat ini secara umum mempunyai ciri berwarna kelabu, bagian thorax berwarna abu-abu kekuningan sampai abu-abu gelap dan mempunyai empat baris hitam longitudinal dengan lebar yang sama dan

membentang sampai ke tepi skutum. Abdomen ditandai dengan warna dasar kekuningan serta didapatkan garis hitam di bagian median yang akan difus sampai di segmen keempat. Pada lalat betina disamping ciri tersebut juga terdapat garis hitam yang difus di kedua sisi abdomen (Sasmita dkk, 2000).

Kepala *M. domestica* relatif besar dengan dua mata majemuk yang bertemu di garis tengah untuk lalat jantan, sedang lalat betina dua mata majemuk terpisahkan oleh ruang muka. Bentuk mulut disesuaikan dengan jenis makanannya yang berupa cairan. Bagian mulut lalat digunakan sebagai alat penghisap makanan yang disebut dengan labium. Pada ujung labium terdapat labela yang menghubungkan antara labium dengan rongga tubuh (*haemocoele*) (Soulsby, 1986).

Saluran pencernaan meliputi stomodeum, mesenteron dan proctodeum. Stomodeum sesungguhnya adalah rongga mulut dengan kelenjar saliva, epifaring dan hipofaring, faring, proventrikulus atau *gizzard* dan *crop* atau diverticulum oesophagus atau kerongkongan. Mesenteron membentuk usus tengah di mana pada akhir posteriornya terdapat sebuah cincin saluran malphigi yang memiliki fungsi ekskresi. Proctodeum terdiri dari usus belakang dan rektum, bersama dengan saluran *malphigi* dan *papilla rectum* (Soulsby, 1986).

Lalat rumah *M. domestica* termasuk familia Muscidae merupakan spesies lalat yang banyak terdapat di seluruh dunia. Pada dunia kedokteran hewan merupakan vektor mekanis beberapa penyakit (Harwood dan James, 1979; Levine dan Levine, 1991). *M. domestica* mempunyai alat mulut untuk menjilat dan tidak dapat menggigit. Larvanya berkembang di dalam kotoran, tumbuh-tumbuhan

busuk. Larva tersebut migrasi ke daerah yang lebih kering untuk menjadi pupa, yang dewasa hinggap ke makanan manusia dan menularkan penyakit usus. Kebiasaan mereka mondar-mandir antara makan dan bertelur. Agen penyakit berpindah dari feses atau ludah pada kutikula dan probosis lalat akibat perilaku yang dikenal dengan istilah regurgitasi (Greenberg, 1973). Cholera, thypoid fever, amoebiasis dan poliomyelitis adalah beberapa penyakit yang disebarkan oleh lalat *M. domestica.* Keberadaan lalat ini di dunia yang perlu diperhatikan adalah dua faktor penting yaitu siklus hidup dan tingkat pertumbuhan yang tinggi (Rutz and Axtell, 1980; Krafsur *et.al.*, 1985; Axtell and Arends, 1990). Tingkat pertumbuhan secara umum dipengaruhi oleh faktor lingkungan (Chapmann and Goulson, 2000). Suhu merupakan faktor lingkungan yang penting untuk pertumbuhan populasi *M. domestica*, khususnya di daerah ekuator dan tropis, di mana menunjukkan tingginya jumlah spesies (Levine dan Levine, 1991) dan juga berperan serta pada siklus hidup dari insekta, termasuk *M. domestica* (Chapmann dan Goulson, 2000).

Lalat *M. domestica* merupakan parasit penyebab *myiasis cutaneus* yang dapat menyerang hewan maupun manusia. Distribusinya meliputi daerah subtropis dan tropis di seluruh dunia. Kerugian yang ditimbulkan terhadap kesehatan manusia dan hewan serta biaya yang dihubungkan dengan kontrol terhadap lalat *M. domestica* ternyata cukup besar (Willadsen, 2000). Adanya ancaman lalat *M. domestica* terhadap industri peternakan mendorong dilakukan penelitian tentang kemungkinan dapat dibuatnya vaksin yang bersifat spesifik terhadap serangan *myiasis cutaneus* yang disebabkan larva lalat *M. domestica.*

2.1.3 Siklus Hidup

Lalat *M. domestica* meletakkan 100-150 telur pada satu kali peneluran dengan jumlah keseluruhan kurang lebih 1000 telur (Gambar 2). Kotoran kuda segar merupakan tempat yang disenangi. Lalat ini meletakkan telur pada kotoran hewan lain juga manusia. Bahan-bahan organik yang membusuk dapat juga sebagai tempat meletakkan telurnya (Hall, 1972). Telur lalat rumah berukuran kurang lebih satu milimeter, memanjang dan warnanya putih krim sedangkan pada permukaan dorsal mempunyai dua lengkung penebalan, seperti tulang rusuk (Soulsby, 1986). Gambar dibawah ini adalah telur lalat *M. domestica*.

Gambar 2. Telur Lalat *M. domestica* (Perbesaran 100x)
Keterangan : Tanda panah warna merah (↑)

Larva lalat pada media feses ayam broiler didapatkan 464 ekor jauh lebih banyak dibandingkan dalam media feses sapi, kambing dan kuda. Feses ayam broiler memiliki kandungan berat kering (BK) 20,984%, abu 3,196%, protein kasar 6,156%, serat kasar (SK) 3,376%, dan bahan ekstrak tanpa nitrogen (BETN) 5,914% (Dharmawati, 2005). Kandungan air yang tinggi merupakan

tempat yang paling disukai lalat (Murtijo, 1992). Pada tingkat kebasahan feses ayam 70% paling banyak ditemukan telur yang diletakkan oleh lalat (Sukarsih *et.al.*, 2000).

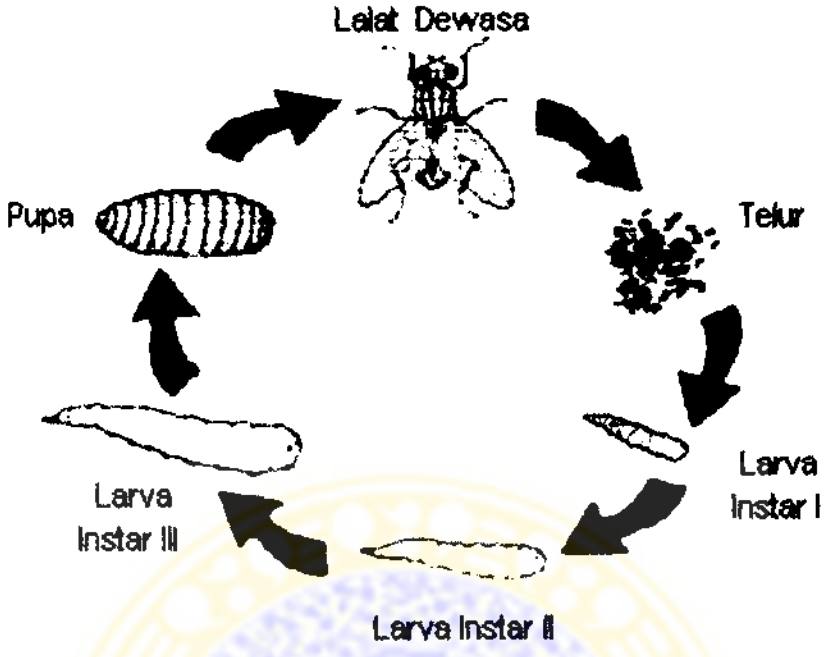
Telur menetas dalam waktu 12-24 jam menjadi larva instar I mempunyai panjang 2 mm, stadium ini berlangsung 24-36 jam tergantung temperatur dan tempat yang cocok. Larva Instar II berlangsung selama 24 jam pada temperatur 25-35 ^{0}C, yang kemudian dilanjutkan dengan larva Instar III yang berlangsung selama 3-4 hari pada temperatur 35 ^{0}C dengan ukuran 10-12 mm (Richard dan Davies, 1977). Tubuh larva meruncing ke anterior dan melebar ke ujung posterior. Pada ujung tersebut terdapat lempeng stigmata. Tiga kali eksdisis terjadi selama tingkat larva Setelah stadium larva selesai, larva bermigrasi ke daerah kering dan berubah menjadi pupa. Tingkat pupa berlangsung selama 26 hari tergantung pada temperatur (Canyon, 1999). Pupa dapat dilihat pada Gambar 3.

Gambar 3. Koleksi Pupa Lalat *M. domestica*
Keterangan : Tanda panah biru (↑)

Fertilisasi dan ovoposisi berlangsung beberapa hari setelah lalat muda keluar dari pupa dan menjadi lalat dewasa. Siklus lengkap menjadi lalat dewasa dapat berlangsung kira-kira delapan hari pada suhu 33-35 ^{0}C sehingga sejumlah generasi berkembang pada musim panas (Richard dan Davies, 1977). Lalat dewasa hanya hidup beberapa minggu pada musim panas tetapi lebih lama pada cuaca yang lebih dingin. Perkembangan berlangsung terus walaupun pada musim dingin, tetapi lalat tidak muncul pada daerah dingin.

Telur, larva dan pupa dapat bertahan terhadap cuaca dingin tertentu sehingga dapat bertahan hidup dan ini bertanggung jawab atas populasi lalat pada musim panas berikutnya. Waktu yang dibutuhkan dalam proses metamorfosis lalat mulai telur sampai lalat dewasa bervariasi di berbagai belahan bumi tergantung pada temperatur dan faktor lain (Sasmita dkk, 2000). Menurut Levine (1990), waktu metamorfosis lalat bervariasi sekitar rata-rata 44,8 hari pada suhu 16 ^{0}C sampai 10,4 hari pada suhu 30 ^{0}C.

Lalat rumah sering regurgitasi untuk membantu makannya (*vomit drop*) dan defekasi dalam waktu yang tidak teratur. *M. domestica* tidak memakan darah tetapi dapat mengikuti lalat penghisap darah, makan darah yang busuk dan cairan jaringan (Sasmita dkk, 2000). Gambar siklus hidup lalat *M. domestica* dari telur, larva instar I, II, III, pupa dan lalat dewasa yang siap meletakkan telur dapat dilihat (Gambar 4) dibawah ini.

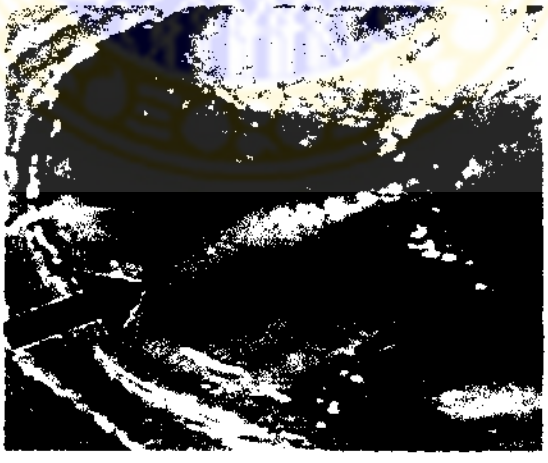


Gambar 4. Siklus Hidup Lalat *M. domestica*
(Keterangan: Sumber Canyon, 1999)

2.1.4 Kejadian *Myiasis*

Kasus belatungan atau *myiasis* di Indonesia ditemukan pertama kali tahun 1923 di daerah Minahasa yang menyebabkan *myiasis* pada kuku sapi dalam bentuk infeksi campuran *C. bezziana* dengan larva lalat *B. intonsus* Aldrich, 1923 (Kraneveld dan Pettinga dikutip partoutomo 2000). Selanjutnya *myiasis* kuku sapi perah di daerah Bogor dalam bentuk infeksi campuran *Sarcophaga dux* dan *Musca domestica*. Kejadian *myiasis* pada sapi penarik di daerah Minahasa dilaporkan mencapai 20% (Muchlis dan Partoutomo, 1971;1973). Kejadian ini penting karena lokasi luka kebanyakan terdapat pada kuku sehingga banyak sapi yang tidak dapat dipekerjakan karena kerusakan jaringan yang ditimbulkan oleh *myiasis* ini menyebabkan sapi tidak dapat bergerak bahkan karena dianggap tidak

produktif lagi banyak sapi yang dijual dan dipotong. Sapi-sapi impor seperti asal Australia (Brahman dan Brahman *cross*) ternyata lebih peka terhadap serangan *myiasis* dibandingkan dengan sapi-sapi lokal (Sigit, 1978; Sigit dan Partoutomo, 1981). Kasus *myiasis* juga menyerang kerbau di Kecamatan Wajo, Sulawesi Selatan. Organ yang diserang adalah telinga bahkan menurut informasi tidak jarang berakibat putusnya daun telinga (Sembiring, 1991). Dari 17 ekor kerbau umur satu sampai delapan tahun yang menderita *myiasis* yang dilaporkan dari daerah tersebut ternyata 15 kasus menyerang telinga bagian dalam, satu kasus menyerang vulva dan satu kasus menyerang rahang bawah (Gambar 4). Atas dasar kejadian *myiasis* tersebut dapat diambil kesimpulan bahwa sebenarnya *myiasis* dapat menyerang berbagai organ dan penyebarannya sangat luas terutama di Indonesia dan dapat dibuat dengan infeksi buatan dengan membuat luka pada kulit hewan yang kemudian dibiarkan lalat-lalat penyebab *myiasis* meletakkan telur-telurnya (Partoutomo, 2000).



Gambar 4. Serangan *Myiasis* Larva Lalat *M. domestica*
(www.akhila.nl/docs/cavia/ziekten/*myiasis*.htm)

2.1.5 Pengendalian *Myiasis*

Sistim pengendalian *myiasis* dengan cara penyemprotan dengan insektisida ataupun pestisida pada ternak dipandang tidak efektif dengan alasan lalat tidak menempel pada tubuh ternak kecuali pada saat bertelur (Partoutomo, 2000). Di samping itu sebagai *myiasis* obligat stadium larva yang hidup di dalam luka merupakan titik rawan bagi kehidupan lalat, sehingga dengan mengobati setiap luka dan membunuh belatungnya dengan teliti maka dalam jangka waktu tertentu populasi lalat di suatu lokasi akan cepat menurun. Cara ini adalah efektif diterapkan secara rutin di semua negara di mana terdapat *myiasis traumatika* atau *myiasis* yang dalam proses terjadinya diawali dengan adanya luka gigitan caplak atau luka traumatik lainnya.

Atas dasar pertimbangan tersebut maka untuk mengatasi *myiasis* dianjurkan untuk menggunakan obat dengan resep sebagai berikut: Diazinon EC 60% 50 ml, Sulfanylamide 100 gram, Minyak ikan 100 ml, Vaselin sabun 900 gram. Diazinon EC berfungsi sebagai pencuci luka dan membunuh belatung, sulfanylamide sebagai anti bakteria, sedangkan minyak ikan berfungsi mempercepat penyembuhan luka. Di dalam mengobati *myiasis* sebaiknya yang diobati tidak hanya bagian *myiasis* saja, tetapi juga luka biasa harus diobati agar cepat kering untuk mencegah masuknya larva lalat dari telur yang menetas di sekitar luka, demikian juga belatung yang baru keluar dari luka *myiasis* atau yang baru diambil dari luka agar ditampung dan segera dimasukkan kedalam larutan insektisida atau pestisida agar mati (Sigit, 1978).

Beberapa obat dilaporkan telah digunakan untuk pengobatan *myiasis* di lapangan antara lain asuntol salep 2%, efektif dan dapat membunuh belatung dalam waktu 24 jam setelah pengobatan dan harganya murah (Muchlis dan Partoutomo, 1971), Minyak tanah, Belerang, Gusanex banyak digunakan peternak di lapangan untuk pengobatan *myiasis* (Sukarsih *et.al.,* 1989), di samping itu, ekstrak tembakau (Sukarsih *et.al.*, 1989; Ediwan, 1998) dan rotenon (Savitri dan Sjamsulhadi, 1998) juga efektif untuk pengobatan *myiasis* di lapangan.

Spradbery dkk, (1976), menyatakan banyak obat yang telah digunakan untuk pengobatan *myiasis* terutama pada sapi. Sebanyak 13 jenis acarisida yang terdiri dari empat golongan yang biasa digunakan untuk pemberantasan caplak di Australia digunakan *myiasis* pada sapi di Papua New Guinea. Empat golongan acarisida tesebut terdiri atas golongan amidine (amitras, chloromethiuron, clenpirin, cyanizole), golongan organophosphorus (bromophos, chlorfenvinphos, chloropyriphos, coumaphos, crotothyphos, dioxathion, plasma). Golongan pyrethroid dikombinasikan dengan golongan organophosphorus dan golongan carbamate. Hasil uji obat-obatan tersebut secara *in vitro* di laboratorium dan *in vivo* di lapangan pada sapi yang diinfeksi secara buatan diperoleh hasil bahwa acarisida golongan organophosphorus, carbamate dan organophosphorus sintetik pyrethroid membunuh larva sangat efektif, sedangkan amidine kurang efektif (Spradbery *et.al.*, 1983). Ivermectin dengan dosis 50, 100, 200 μg/kg berat badan dan diinjeksikan di bawah kulit memberikan kesembuhan *myiasis* secara total masing-masing dalam waktu 6, 12 dan 14 hari. Dengan dosis 200 μg/kg berat badan. Ivermectin mengakibatkan mortalitas 100% pada larva umur 2 hari. Pada

waktu pengobatan, dengan dosis ini berakibat mortalitas larva umur 3, 4 dan 5 hari masing-masing sebesar 70%, 64%, 21% (Spradbery *et.al.*, 1985). Spradbery *et.al.*, (1976) menerangkan obat lain yang efektif seperti EQ 335 berisi lindane 3% juga digunakan tetapi mahal, demikian pula Gusanex yang berisi dichlorfenthion 1%. Selain obat-obatan pengendalian *myiasis* juga dapat dilakukan dengan pengendalian biologis dengan melepaskan lalat jantan yang disterilkan dengan radiasi (*Sterile Insect Release Method* = SIRM).

2.2 Protein

Protein merupakan polipeptida dengan berat molekul berkisar antara 10^5-10^6 dalton, beberapa protein larut dalam air sedangkan lainnya larut dalam garam encer. Banyak protein telah pecah dan dimurnikan berdasarkan atas ukuran molekul dan kelarutannya (Driyer, 1993).

Protein gabungan terdiri atas protein sederhana yang bergabung dengan komponen yang bukan protein atau yang bukan asam amino, yang lazim disebut gugus prothetik. Protein gabungan ini contohnya masing-masing adalah sebagai berikut: glikoprotein, mencakup mukopolisakarida dan oligosakarida sebagai gugus-gugus prothetiknya (di dalam jaringan ikat dan mukosa saliva); lipoprotein, gugus prothetiknya adalah lemak (di dalam plasma darah dan kuning telur); mukoprotein, gugus prothetiknya ialah Fe, Zn atau Cu (dalam transferin darah, fertin, anhidrose karbonat) dan fosfoprotein, gugus prothetiknya adalah fosfat (kasein dalam susu, vitellin dalam telur) (Frandson, 1992).

Protein derivat adalah hasil pemecahan dari protein yang ada di dalam, supaya dikurangi kompleksitasnya. Contohnya derivat protein primer, metaprotein, protein koagulasi, derivat protein sekunder, proteose, peptose dan peptide (Frandson, 1992).

Protein merupakan suatu rantai peptida atau polipeptida yang dihasilkan atau disintesa karena ekspresi gen, ekspresi gen yang menghasilkan protein melibatkan dua tahap proses yaitu transkripsi dan translasi. Transkripsi adalah proses pemindahan informasi genetika dari DNA ke RNA. Sedangkan sintesis protein atas dasar kode genetik kodon-kodon mRNA disebut translasi (Rahayu, 1998). Agar ekspresi gen dapat diwujudkan dalam waktu dan besaran yang tepat sesuai pula dengan sifat dan karakter gen, maka perlu ada pengaturan pengendalian ekspresi gen (Hartiko, 1998).

Protein juga dapat ditransfer dari gel membran ke dalam membran nitroselulose menggunakan alat model Bio-Rad yang konvensional, tetapi kebanyakan transfer protein dilakukan dengan teknik elekroforesis (Rantam, 2003).

Penelitian terhadap larva penyebab *myiasis* yaitu *Lucilia cuprina* menunjukkan bahwa vaksinasi yang dilakukan terhadap domba dengan beberapa glikoprotein membran intrinsik dari membran peritrofik larva yang disebut peritrofin, menunjukkan adanya respon imun yang dapat menghambat pertumbuhan larva (East *et.al.*,1993). Mekanisme hambatan disebabkan adanya ikatan antibodi dengan peritrofin di dalam matrik peritrofin, sehingga memblokade lubang pada membran peritrofin dan mengganggu proses pencernaan

yang normal pada larva (Casu *et.al.*, 1997; Tellam dan Eisemann, 1998). Sudah terbukti bahwa peritrofin dari membran peritrofik *L. cuprina* relatif lebih banyak (Elvin *et.al.*,1996). Percobaan vaksinasi dengan menggunakan membran peritrofik yang utuh dari *C. bezziana* (Sukarsih *et.al.*, 2000) diduga mempunyai mekanisme yang hampir sama dengan vaksin yang menggunakan fraksi dari membran peritrofik *C. bezziana* (Riding *et.al.*, 2000) terhadap larva *screwworm*. Pada uji *in vivo* larva pada domba yang telah divaksin dengan membran peritrofik atau fraksi dari membran peritrofik menunjukkan penurunan pertumbuhan dan yang terpenting tampak adanya peningkatan mortalitas larva *C.bezziana*.

Uji efikasi beberapa bentuk protein membran peritrofik recombinan Cb15, Cb 42 dan Cb 48 dari lalat screwworm *C. bezziana* telah dilakukan secara *in vivo* dan *in vitro*, yaitu sebagai antigen pada vaksinasi untuk mencegah serangan larva lalat terhadap jaringan tubuh domba (Sukarsih *et.al.*, 2000).

Hasil analisis protein untuk mengetahui berat molekul protein antigen larva lalat *M. domestica* dilakukan dengan teknik SDS-PAGE menunjukkan adanya empat macam pita protein masing-masing adalah 143,3 kDa; 113,2 kDa; 78,5 kDa dan 66,5 kDa. Sedangkan protein yang lain terlihat diekspresikan dengan bentuk yang lebih tipis dan intensitas warna yang kurang. Pita protein yang dominan yang sering kali muncul dari semua stadium yaitu larva, pupa, dan dewasa baik jantan dan betina serta bagian-bagian tubuh lalat *M. domestica* adalah 113.2 kDa; 78,5 kDa; 70 kDa; 66,5 kDa dan 57,3 kDa, kemungkinan protein-protein ini yang bersifat imunogenik (Mufasirin dan Hastutiek, 2004).

2.3 Antigen

Antigen adalah substansi yang bila diperkenalkan pada suatu spesies asing dapat menimbulkan pembentukan antibodi (Ab) pada binatang hidup dapat bereaksi secara spesifik dengan antigen tersebut. Pada umumnya antigen-antigen lengkap adalah protein, tetapi beberapa adalah polisakarida atau polipeptida. Kebanyakan antigen-antigen adalah makromolekuler yang mempunyai berat molekul diatas 10 kDa. Agar bekerja sebagai antigen, suatu substansi harus dinilai asing oleh seekor binatang, karena pada umumnya binatang tidak membentuk Ab terhadap protein-proteinnya sendiri atau *self* (Jawetz, *et. al.*, 1991).

Rantam (2003), antigen adalah substansi yang dapat dikenali dan diikat dengan baik oleh sistem imun. Antigen dapat berasal dari organisme (bakteri, virus, jamur dan parasit) atau molekul asing bagi tubuh. Tidak setiap bagian dari antigen dapat berinteraksi dengan molekul sistem imun. Bagian dari antigen secara langsung berikatan dengan molekul reseptor (seperi antibodi) yang dikenal dengan *epitop*. Hal ini menandakan bahwa antigen mempunyai beberapa epitop.

Hapten adalah molekul organik kecil yang dapat mengikat bagian reseptor antigen. Meskipun molekul ini kecil tetapi dapat menginduksi respon imun sendiri. Selain itu juga dapat menginduksi antibodi dengan titer yang tinggi jika diikatkan dengan *carrier* berupa protein yang mempunyai berat molekul tinggi atau polimer sintetik.

Roitt *et.al.* (1993) dan Turner (1994) menyebutkan istilah antigen digunakan untuk beberapa molekul yang dapat mempengaruhi sel B memproduksi antigen yang spesifik. Akan tetapi istilah antigen harus diperluas untuk

menunjukkan beberapa molekul yang secara spesifik dikenal oleh sistim imunitas yaitu sel B, sel T atau keduanya.

Antigen dapat diartikan sebagai substansi yang spesifik berkaitan dengan antibodi makromolekuler seperti: karbohidrat komplek, fosfolipid, asam nukleat dan protein dapat digunakan sebagai antigen. Antibodi yang berikatan secara spesifik dengan makromolekuler disebut *determinan* atau *epitop* (Abbas *et.al.*, 1991).

Sifat-sifat umum antigen yang bersifat imunogen: 1) Keasingan yaitu: dalam keadaan normal sistim imum membedakan antara *self* dan *non self*. 2) Ukuran, Ag harus mempunyai ukuran minimum yang efektif dengan berat molekul lebih kurang 10 kDa. 3) Kompleksitas, faktor yang menentukan kompleksitas imunogen yaitu sifat fisik dan kimia molekuler (Wahab dan Noerjati, 1993).

2.4 Antibodi

Antibodi adalah *protein imunoglobulin* yang disekresi oleh sel B yang teraktivasi oleh antigen. Berat molekul antibodi berkisar 150.000 Da sampai 950.000 Da yang tergantung pada kelasnya. Semua molekul antibodi terdiri dari dua untaian peptida pendek yang sama dikenal dengan *light chain*, sedang yang terdiri dari untaian peptida yang panjang disebut *heavy chain*. Keduanya terikat secara kovalen bersama yang disebut *ikatan disulfida*. Struktur imunoglobulin terdiri dari fragmen ab (*Fab*) dan fragmen c (*Fc*), kedua fragmen ini dirangkai oleh untaian dua sulfida (s-s). Bagian yang terdiri dari asam amino yang bertugas

untuk mengikat antigen dikenal dengan *side binding antigen*, sedang *Fc* terdiri dari karbohidrat yang sering berikatan dengan komplemen. Rantam (2003).

Antibodi adalah protein yang terbentuk sebagai respon terhadap antigen yang bereaksi secara spesifik dengan antigen itu atau sesuatu yang mempunyai hubungan erat dengannya. Hanya golongan vertebrata saja yang membuat antibodi-antibodi. Antibodi adalah protein khusus, yaitu imunoglobulin-imunoglobulin. Sifat antibodi ini antara lain tergantung pada kelas imunoglobulin di mana imunoglobulin ini tergolong (Jawetz *et. al.*, 1991).

Imunoglobulin merupakan 20% dari jumlah protein serum dan suatu bagian yang variabel dari imunoglobulin memiliki daya antibodi. Antibodi dapat dikenal melalui sifat-sifat kimia-fisik. Diantara sifat-sifat kimia-fisik utama yang digunakan untuk klasifikasi antibodi adalah daya larut dalam garam-garam dan pelarut-pelarut, mobilitas elektroforesis, ukuran molekul dan pengendapan pada alat pemusing ultra. Secara elektroforesis, sebagian bergerak bersama-sama fraksi–fraksi Gamma dan Beta dan sedikit dengan globulin Alfa (Tizard, 1987; Noel and Krieg, 1993).

Antibodi diproduksi dari respon satu antigen yang secara nyata harus memadai struktur yang berbeda dari antibodi yang diproduksi dari respon antigen lainnya, sebagai contoh Ab tetanus harus berbeda struktur kimianya dengan Ab dipteria. Tempat pengikatan antigen atau tempat aktivitas antibodi di molekul. Imunoglobulin adalah daerah yang dikombinasi dengan antigen spesifik (Wahab dan Noerjati, 1993).

Antibodi atau imunoglobulin adalah struktur yang berhubungan dengan glikoprotein diproduksi oleh limfosit B yang berfungsi sebagai moderator spesifik imunitas humoral. Semua antibodi umumnya mempunyai dua struktur rantai ringan (*light chain*) dan 2 struktur rantai berat (*heavy chain*) yang identik serta dihubungkan satu dengan yang lainnya oleh ikatan disulfida (Crighton, 1984; Abbas *et.al.*, 1991; Norris and Varma, 1992).

Langkah pertama dalam pembentukan antibodi adalah fagositosis antigen oleh makrofag. Makrofag ini memberikan antigen pada sel-sel B dan sel-sel T helper. Sel-sel yang membawa imunoglobulin pada permukaannya yang cocok dengan antigen dirangsang untuk proliferasi membentuk klon, dan berdeferensiasi menjadi sel-sel plasma. Sel plasma mensintesa protein antibodi (Jawetz *et.al.*, 1991; Vilk,1992).

2.5 Immunitas Terhadap Parasit

Imunitas merupakan semua mekanisme fisiologis yang membantu mengenal benda-benda asing, menetralkan, menyisihkan (*eliminate*) atau memetabolisasi benda asing tersebut (Bellanti, 1993). Secara alami sel imun merupakan keturunan dari leukosit termasuk kedua sel limfosit dan sel myeloid. Sel stem dalam sumsum tulang migrasi ke beberapa macam jaringan dan matang menjadi sel imun kompeten yang berbeda (Rantam, 2003). Imunitas terhadap parasit termasuk protozoa dipengaruhi letak kolonisasinya dan luas jaringan yang terlibat (Bellanti, 1993).

Parasit memiliki ukuran yang lebih besar dari bakteri dan virus, sehingga mengandung lebih banyak antigen baik dalam jumlah maupun jenis. Antigen yang berasal dari parasit akan menjadi imunogen apabila dikenal sebagai benda asing dengan berat molekul tertentu. Respon humoral didapat pada respon terhadap stadium yang ada dalam sirkulasi darah dan respon seluler dijumpai pada agen dengan perkembangan intraseluler (Bellanti, 1993).

2.6 Immunisasi Hewan Coba

Salah satu prinsip dari sistem immun adalah berfungsi sebagai pelindung bagian tubuh hewan terhadap organisme dari luar tubuh. Sistem ini bekerja melalui reseptor dengan spesifitas tinggi. Adanya benda asing yang masuk nanti akan berikatan dengan reseptor sehingga oleh limfosit dihasilkan produk berupa protein spesifik atau disebut antibodi.

Dalam proses immunisasi dimasukkan antigen secara berulang-ulang sehingga dihasilkan serum hiperimmun atau antibodi poliklonal (Smith, 1995). Untuk memproduksi serum hiperimmun hewan harus diimmunisasi dengan sengaja sehingga dalam pemanenan mendapatkan titer antibodi yang tinggi. Untuk mendapatkan titer antibodi yang tinggi perlu ditambahkan adjuvant komplit pada saat immunisasi, diulang dengan menggunakan adjuvant inkomplit beberapa kali untuk mempercepat laju antibodi poliklonal (Tizard, 1988).

Adjuvant adalah substansi-substansi tertentu yang dapat meningkatkan secara tidak spesifik efektifitas immunologis dari agen pengimmunisasi. *Adjuvant* mempunyai sifat-sifat tertentu sebagai karakteristiknya terutama membuat depot

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

Dot blot merupakan salah satu metode dari imunobloting yang digunakan untuk mendeteksi ikatan antigen dengan antibodi. Uji *dot blot* digunakan mendeteksi secara kualitatif Ig M pada serum atau plasma darah yang diambil dari sampel darah hewan dengan menunjukkan gejala klinis yang dilakukan secara *in vitro*, maka didapatkan adanya beberapa serotipe lainnya dari hasil *dot bloting* (Anominus[a], 2002).

Menurut Sumitro dkk (1998), pemeriksaan antibodi dengan menggunakan *dot bloting* dapat digunakan sebagai penetapan adanya protein pada serum, sedangkan teknik *western blot* hampir sama dengan pemisahan protein melalui SDS-PAGE, dan yang pertama dimasukkan adalah *whole protein*. Kemudian diamati adanya band-band sebagai reaksi positif antigen dan antibodi, sedangkan *dot blot* yang diamati munculnya noktah (dot) yang biru keunguan.

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di bagian Parasitologi Laboratorium Entomologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Unair, Laboratorium Patologi Klinik Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Unair, Laboratorium Biologi Molekuler Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Waktu penelitian selama empat bulan mulai bulan Juli 2005 sampai dengan Oktober 2005.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Unit Analisis

Unit analisis yang digunakan dalam penelitian ini adalah *whole* protein larva instar III lalat *M. domestica*.

3.2.2 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah lalat *M. domestica* dewasa jantan dan betina yang diperoleh dari sekitar rumah, tempat sampah serta pasar dengan menggunakan perangkap lalat. Sampel dibawa ke Laboratorium Entomologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dibiakkan untuk dikoleksi larvanya. Larva yang dikoleksi kemudian dibersihkan dengan aquadest dan diberi PBS kemudian dibawa ke Laboratorium Patologi Klinik untuk kemudian diperiksa kadar proteinnya. Setelah diperiksa kadar proteinnya hasil dibawa ke Laboratorium Biologi Molekuler untuk dilakukan

serangkaian pemeriksaan antara lain: SDS-PAGE, ELISA dan *Dot Blot*. Namun dalam penelitian ini tidak dibahas pemeriksaan mengenai SDS-PAGE dan ELISA secara rinci. Hasil fraksinasi protein larva *M. domestica* dengan SDS-PAGE terdapat beberapa pita protein dengan berat molekul tertentu (Hasil diperoleh dengan membandingkan dengan *standart marker*). Hasil ELISA (Lampiran 5), tujuan pemberian lampiran hasil ELISA ini adalah sebagai patokan dalam uji *dot blot*. Pada Uji *dot blot* diperlukan persiapan alat dan bahan-bahan antara lain:

a. Alat-alat

Peralatan yang digunakan meliputi: *mikropipet multi channel, pipet tip, petridish, water bath, Shaker*, tabung eppendorf, gelas ukur, gunting atau *cutter*, pensil, penjepit pinset.

b. Bahan-bahan

Bahan-bahan yang diperlukan adalah Kertas *Membran Nitroselulose* (NCM); *Tris Buffer Saline* (TBS); *Bovine Serum Albumin* (BSA) 1%; *Tween* 0,05%; *Western Blue Substrat*, *aquadest*, *antigen* dari *whole* protein larva *M. domestica*, *Antibodi* dari serum hewan coba, *Ab Konjugat AP*.

3.3 Metode Penelitian

Metode dan langkah-langkah yang dilakukan dalam penelitian ini adalah:

1. *Rearing* lalat dan koleksi larva instar III lalat *M. domestica*
2. Isolasi *whole* protein larva instar III lalat *M. domestica*
3. Produksi antibodi poliklonal pada kelinci
4. Uji *dot blot whole* protein larva instar III lalat *M. domestica*

3.3.2 Isolasi *Whole* Protein Larva Instar III Lalat *M. domestica*

Sebanyak 100 ekor larva instar III lalat *M. domestica* dimasukkan ke dalam tabung *konikal* 15 ml dan dicuci tiga kali dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) sampai larva terlihat bersih kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm selama lima menit, setelah bersih ditambahkan empat ml PBS. Supernatan diambil disimpan pada suhu –20 °C dan siap untuk dilakukan fraksinasi protein. Konsentrasi protein diukur menggunakan spektrofotometer OD_{540}.

3.3.3 Produksi Antibodi poliklonal pada kelinci

Antibodi poliklonal dibuat dengan jalan menginjeksikan ekstrak larva (hasil isolasi) pada kelinci jantan lokal sehat sebanyak dua ekor. Immunisasi awal diberikan sebanyak 50-500 µg/ml protein larva dengan penambahan *complete freud's adjuvant* sama banyak. Penyuntikan dilakukan di bawah kulit pada empat lokasi tubuh yang mempunyai kulit longgar. Injeksi diulang dengan protein yang sama dengan penambahan *incomplete adjuvant* (sigma) pada dua minggu setelah penyuntikan pertama. Penyuntikan ulang (booster) berikutnya menggunakan protein yang sama dengan *incomplete adjuvant* dengan cara yang sama sebanyak sembilan kali hingga didapatkan titer antibodi yang tinggi. Sebelum dilakukan penyuntikan pertama dilakukan pengambilan serum sebagai kontrol negatif dalam uji ELISA. Pengambilan serum selanjutnya dilakukan sebelum penyuntikan ulang (booster). Tujuan pengambilan serum setiap sebelum penyuntikan ulang (booster) adalah untuk melihat respon antibodi setiap setelah penyuntikan dengan uji yang sama.

itu disimpan pada 4^0C dalam TBT jika diperlukan (Gambar 7). HRP divisualisasikan dengan substrat *4-chloro-1-naphthol* yang produk warnanya *purple grey* dan akhirnya *blot* dikeringkan dengan kertas saring. Pengenceran yang tinggi dan mampu menimbulkan warna dipilih untuk dapat digunakan sebagai patokan *western blot* (Rantam, 2003).

Gambar 7. Proses Pencucian Membran Nitroselulose pada Uji *Dot Blot*

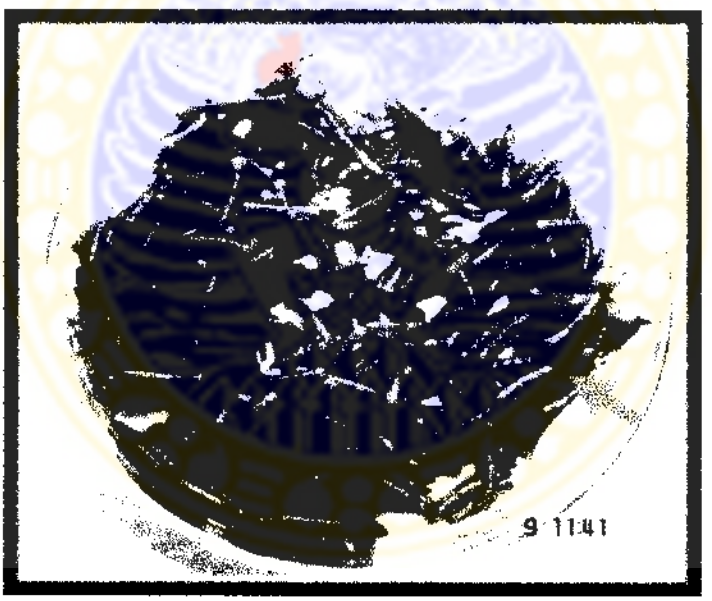
keterangan:
1. Panah merah→ shaker
2. Panah hijau→ kertas membran nitroselulose dengan pengenceran Antibodi.
3. Panah kuning→ kertas membrane nitroselulose dengan pengenceran Antigen.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1 *Rearing* Lalat dan Koleksi Larva Instar III *M. domestica*

Rearing lalat *M. domestica* jantan dan betina menghasilkan telur dalam beberapa hari. Telur lalat *M domestica* menetas dan diperoleh larva instar I hingga larva instar III, kemudian larva Instar III dicuci dengan Phospat Buffer Salin (PBS) dan dikoleksi untuk dilakukan ektraksi *whole* protein larva, sebagian lainnya di*rearing* sampai dewasa.



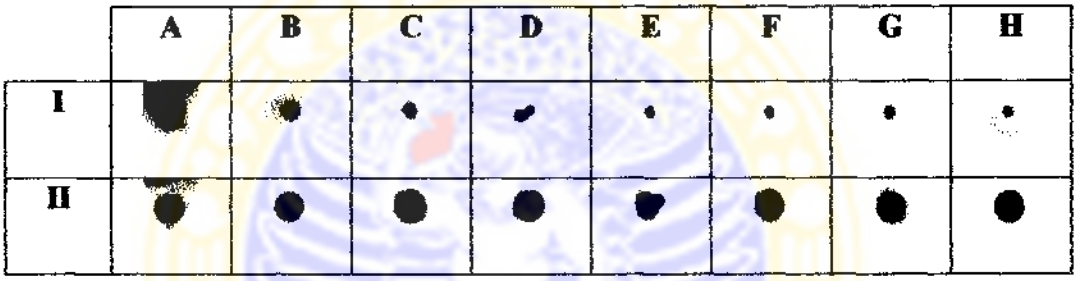
Gambar 8. Hasil Koleksi Larva Instar III Lalat *M. domestica*
Keterangan : Panah ungu (⇧)

4.2 Pengukuran Kadar *Whole* Protein Larva Instar III *M. domestica*

Hasil pengukuran ektraksi *whole* protein larva instar III lalat *M. domestica* diukur dengan alat spektrofotometer dengan OD_{540}, diketahui kadar proteinnya sebesar **0,53** μg/μl.

4.3 Karakterisasi *Whole* Protein Larva dengan *Dot blot*

Hasil uji *dot blot* menunjukkan bahwa antigen dari *whole* protein larva instar III lalat *M. domestica* berikatan dengan antibodi yang berasal dari serum hewan coba (kelinci). Hasil yang positif dapat terlihat dengan adanya noktah-noktah dengan warna yang cukup pekat. Gradasi warna menunjukkan konsentrasi antigen yang terdapat pada noktah. Semakin pekat maka konsentrasi antigen makin tinggi dan sebaliknya semakin terang maka konsentrasi antigen makin rendah. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 9. Hasil Uji *Dot Blot* Protein Larva Instar III Lalat *M. domestica*

Keterangan:

Baris I : **Antigen yang diencerkan** + Antibodi + Ab Konjugate AP

Kolom A = Pengenceran 2^0 = 1
Kolom B = Pengenceran 2^{-1} = 1/2
Kolom C = Pengenceran 2^{-2} = 1/4
Kolom D = Pengenceran 2^{-3} = 1/8
Kolom E = Pengenceran 2^{-4} = 1/16
Kolom F = Pengenceran 2^{-5} = 1/32
Kolom G = Pengenceran 2^{-6} = 1/64
Kolom H = Pengenceran 2^{-7} = 1/128

Baris II : Antigen + **Antibodi yang diencerkan** + Ab Konjugate AP

Kolom A = Pengenceran 1/40
Kolom B = Pengenceran 1/80
Kolom C = Pengenceran 1/160
Kolom D = Pengenceran 1/320
Kolom E = Pengenceran 1/640
Kolom F = Pengenceran 1/1280
Kolom G = Pengenceran 1/2560
Kolom H = Pengenceran 1/5120

	A	B	C	D	E	F	G	H
K	–	–	–	–	–	–	–	–
I	+	+	+	+	+	+	+	+
II	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabel 1. Hasil Analisis Uji *Dot Blot* Protein Larva Instar III Lalat *M. domestica*

Keterangan:

K : **Kontrol (–)**
Baris I : **Antigen yang diencerkan** + Antibodi + Ab Konjugate AP
Kolom A-H : Pengenceran antigen = 2^0-2^{-7} (1 sampai 1/128)

Baris II : Antigen + **Antibodi yang diencerkan** + Ab Konjugate AP
Kolom A-H : Pengenceran antibodi = 1/40 sampai 1/5120

BAB V

PEMBAHASAN

5.1 *Rearing* Lalat dan Koleksi Larva Instar III *M. domestica*

Rearing lalat dilakukan dengan mengumpulkan lalat *M. domestica* untuk dipelihara. Pemeliharaan lalat ini dimaksudkan untuk mendapatkan larva instar III yang proteinnya digunakan sebagai sumber antigen yang akan dipakai dalam uji *dot blot*. Setelah beberapa hari lalat betina yang gravid meletakkan telurnya pada media feses dan telur-telur tersebut menetas menjadi larva instar I hingga larva instar III. Dalam penelitian ini digunakan larva instar III karena merupakan stadium larva yang dianggap paling sempurna dan memudahkan dalam pengkoleksian karena memiliki ukuran yang paling besar dari stadium larva yang lain. Pengkoleksian Larva instar III dilakukan dengan menggunakan penjepit pinset satu-persatu dan dikumpulkan pada cawan petri dan dicuci dengan Phospat Buffer Saline (PBS) tiga kali sampai bersih.

Menurut Wandhana dkk., (2003) pengawetan insekta yang baik adalah dengan cara membunuhnya dalam air panas kemudian disimpan dalam etanol 70-80%, metode ini dapat melindungi protein larva dan mencegah larva menjadi hitam. Sedangkan pengawetan dengan formalin menyebabkan jaringan larva menjadi rapuh sehingga tidak dianjurkan untuk keperluan analisis molekuler kecuali untuk keperluan pembuatan preparat histologik (Shauff, 2001). Larva yang sudah bersih kemudian diletakkan dalam tabung dan disimpan di dalam referigrator. Setelah itu larva yang dikoleksi diukur kadar proteinnya.

5.2 Pengukuran Kadar *Whole* Protein Larva Instar III *M. domestica*

Sekitar 100 ekor larva instar III *M. domestica* yang telah dikoleksi dimasukkan dalam tabung *konikal* 15 ml dan dicuci beberapa kali dengan PBS dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu 4 ^{0}C selama 5 menit, setelah bersih ditambahkan 4 ml PBS. Supernatan diambil dan dilakukan pengukuran kadar *whole* protein dari larva instar III lalat *M. domestica.* Pengukuran dapat dilakukan dengan cara hasil sentrifugasi larva diambil 1 µl diletakkan pada tabung baca dan diukur dengan alat spektrofotometer dengan OD_{540}, dan dapat diketahui kadar proteinnya sebesar **0,53** µg/µl. Pengukuran kadar protein ini dimaksudkan untuk mengetahui berapa kadar protein yang akan disuntikkan pada hewan coba. Pada prosedur imunisasi penyuntikan secara subkutan atau intramuskular menggunakan 50-500 µg antigen (Franks, 1988).

5.3 Karakterisasi *Whole* Protein Larva dengan *Dot blot*

Hasil uji *dot blot* protein larva *M. domestica* yang direaksikan dengan serum asal hewan coba (kelinci) menunjukkan adanya ikatan antigen-antibodi yang terlihat dengan *dot* atau noktah. Analisa protein larva *M. domestica* dengan konsentrasi antigen yang diencerkan (Baris I): 2^0, 2^{-1}, 2^{-2}, 2^{-3}, 2^{-4} ,2^{-5} ,2^{-6}, 2^{-7} menunjukkan hasil positif, dengan antibodi asal serum kelinci yang tidak diencerkan. Warna terlihat makin terang pada pengenceran antigen yang makin tinggi. Pada baris II antigen yang tidak diencerkan direaksikan dengan antibodi asal serum hewan coba (kelinci) yang diencerkan 1/40 sampai 1/5120 menunjukkan hasil yang sama dengan baris I (positif). Warna noktah terlihat

makin terang pada pengenceran yang makin tinggi. Hasil analisis uji *dot blot* ini seluruhnya positif dan dapat dikatakan bahwa protein larva *M. domestica* merupakan protein yang antigenik. (Hasil Pengamatan dan konfirmasi langsung dengan Bapak Mufasirin, M.Si., Drh).

Menurut Rantam, (2003) Gradasi warna menunjukkan adanya variasi konsentrasi antigen atau antibodi di dalam *dot* yang dideteksi. Konsentrasi antibodi yang makin tinggi menunjukkan warna yang semakin gelap sebaliknya makin rendah konsentrasi warna yang nampak akan semakin terang. Jadi *dot blots* hanya digunakan untuk mengetahui jenis antigennya bukan berat molekul proteinnya. Namun demikian estimasi konsentrasi antigen dapat diketahui pada *blots* tersebut.

Posisi antigen yang dicari dapat diidentifikasi pada membran dengan mereaksikannya pada antibodi spesifik yang bertanda atau dilabel dengan radioisotop. Antibodi yang telah dilabel tersebut akan menghasilkan bercak chemilunesen dan menunjukkan posisi kompleks antigen-antibodi yang dicari (Kresna, 2001).

Hasil dari penelitian ini, dengan adanya warna yang timbul menunjukkan bahwa terdapat ikatan antara antigen dengan antibodi, sehingga dapat disimpulkan bahwa antibodi pada serum kelinci dapat berikatan dengan protein larva *M. domestica* yang bersifat antigenik. Antibodi yang terbentuk adalah antibodi poliklonal yang dihasilkan oleh sistem imun kelinci.

Bellanti (1993), menyatakan bahwa parasit mengandung berbagai macam antigen, beberapa diantaranya adalah spesifik stadium dan bersifat

sementara dan yang lain tetap ada pada seluruh daur hidup parasit dan dapat merangsang terus-menerus respon imunologik yang berbeda.

Menurut Baratawidjaya (2000), bila antigen dimasukkan ke dalam sistem imun hewan coba, semua sel B yang mengenal *epitop* pada antigen akan dirangsang untuk memproduksi antibodi. Darah yang diambil dari hewan tersebut akan mengandung antibodi yang multipel dan akan bereaksi dengan setiap epitop. Serum tersebut disebut poliklonal karena mengandung produk dari banyak sel B. Keuntungan antibodi poliklonal dibandingkan dengan antibodi monoklonal adalah lebih sensitif dalam mengenal antigen walaupun spesifitasnya lebih rendah (Tizzard, 1982).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Hasil uji *dot blot* menunjukkan positif secara keseluruhan hal tersebut terlihat dari noktah-noktah yang timbul pada kertas membran nitroselulose (NCM) yang tampak dengan gradasi warna noktah yang cukup pekat. Hasil analisis noktah yang terlihat maka dapat diambil kesimpulan bahwa protein larva lalat *M. domestica* bersifat antigenik.

6.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang protein larva *M. domestica* secara kuantitatif melalui uji *western blot* untuk mengetahui berat molekul dari protein larva yang bersifat antigenik serta pemurnian protein melalui pemeriksaan kromatografi.

RINGKASAN

Benny Aprissa Surya P. Identifikasi Protein Antigenik Larva Instar III Lalat Rumah (*M. domestica*) dengan Uji *Dot Blot*. Penelitian ini di bawah bimbingan Bapak Benyamin Chr. Tehupuring, MSi., Drh. selaku Dosen Pembimbing Pertama dan Bapak Dr. Hardijanto, MS., Drh. selaku Dosen Pembimbing Kedua.

Penelitian ini dilakukan untuk menjawab permasalahan apakah dengan uji *dot blot whole* protein larva instar III lalat *M. domestica* menunjukkan sifat antigenik, serta bertujuan untuk mengidentifikasi apakah *whole* protein larva instar III lalat *M. domestica* bersifat antigenik melaui uji *dot blot*.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Entomologi bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Unair, Laboratorium Patologi Klinik Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Unair, Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Di dalam penelitian ini dilakukan beberapa metode penelitian yaitu: 1. *Rearing* Lalat dan Koleksi Larva Instar III Lalat *M. domestica*, 2. Isolasi *whole* protein larva instar III lalat *M. domestica*, 3. Produksi antibodi poliklonal pada kelinci, 4. Uji *dot blot whole* protein larva instar III lalat *M. domestica*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar *whole* protein larva instar III lalat *M. domestica* hasil ekstraksi dengan alat spektrofotometer dengan OD_{540} adalah 0,53 μg/μl. Hasil Uji *dot blot* secara keseluruhan positif. Hal tesebut terlihat dari timbulnya noktah pada kertas membran nitroselulose (NCM) dengan

gradasi warna yang cukup pekat hingga pengenceran tertinggi, hal itu berarti antigen dari protein larva dapat berikatan dengan antibodi dari serum kelinci.

Berdasarkan hasil uji *dot blot* ini memberikan bukti bahwa protein larva instar III lalat *M. domestica* bersifat antigenik dan dapat menimbulkan respon imun pada hewan coba maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yang diarahkan untuk pengembangan vaksin yang sesuai dan protektif untuk optimalisasi pencegahan dan pengendalian kasus *myiasis* di lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

Abbas, A.K., M.L. Andrew dan J. Pober. 1991. Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunder Company. USA. P 37-40.

Anonimus[a], 2002. Leptospira Bifleksa Ig M Detection by Dot Blot Arum Laboratories. Chipeta Way. Salt Lake City. UT. P1-3.

Axtell, R.C. dan J.J. Arends. 1990. Ecology and Management of Arthropods Pest of Poultry. Ann.Vet. Entomol., 35, 101-126.

Baratawidjaya, K.G. 2000. Immunologi Dasar. Edisi keempat. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 22-37, 151-158.

————, 2002.Immunologi Dasar. Edisi kelima. Balai Penerbit Fakultas kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Hal. 13, 29, 33 dan 36.

Bellanti, J.A. 1993. Immunologi III (Terjemahan A.S. Wahab) Gajah Mada University Press. Yokyakarta.

Canyon, D.A. 1999. Review of the *Musca domestica* and *Stomoxys calsitrans* (Diphtera : Cullicidae). Townsville Qld. Autralia.

Casu, R., C. Eisemann, R. Pearson, G. Riding, I. East, A. Dinaldson, L. Cadogan dan R.Tellam. 1997. Antibody-mediated Inhibitian of The Growth of Larvae from an Insect Causing Cutaneus Myiasis in a Mammalia host. Proc. of The National Academy of Scienses of The United States of America. 94 : 8939-8944.

Chapman, J.W. dan Goulson, D. 2000. Environmental Versus Genetic Influences on Fluctuating Asymmetry in The House Fly, *Musca domestica*. Biol. J. Linn, 70, 403-413.

Clarke, G.M. 1991. Report on A sterile Insect Release Trials for Control of The Old World Screwworm Fly *Chrysomya bezziana* in Papua New Guine. Aust. Vet. J. 68 : 277-279.

Crighton, D.B., 1984. Immunological Aspect of Reproduction in Animals. Robert Hortnall Ltd. England. P 27-28.

Dharmawati, A. 2005. *Rearing* (Perkembangbiakan) Larva Lalat Rumah (*Musca domestica*, Linneus) pada Beberapa Media Feses Ternak Di Laboratorium. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Driyer, R.L. 1993. Biokimia Suatu Pendekatan Berorientasi Kasus. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. Hal 45-51.

East, I.J., C.J. Fitzgerald, R.D. Pearson, R.A. Donaldson, T. Vuocolo, L.C. Cadogan, R.L.Tellam, dan C.H. Eiseman.1993. *Luclilia cuprina* : Inhibition of Larval Growth Induced by Immunization of Host Sheep with Extracts of Larval Peritropic Membrane. Int. J. Parasitol. 23 : 221-229.

Ediwan. 1998. Data tentang myiasis di BPPH III Bandar Lampung. Balai Penyidikan Penyakit Hewan Wilayah III, Bandar Lampung.

Elvin, C.M., T. Vuocolo, R. Pearson, I.J. East, G. Riding, C. Eismann, dan R.L. Tellam. 1996. Characterization of Major Peritrophic Membrane Protein, Perithropin-44, From The Larvae of *Lucilia cuprina*; cDNA and Deduced Amino Acid Sequences. *J. Biol. Chem.* 271: 8925-8935.

Frandson. 1992. Anatomy and Phisiology of Farm Animal 4th Ed. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. P 23-25.

Frank, F.1998. Characterization of Protein. Pafra Ltd. United Kingdom. 415-425.

Greenberg, B. 1973. Flies and Disease. Biology Disease Transmission. New Jersey: Univ. Press Princeton.v.2.

Hall, H.T.B. 1972. Disease and Parasitic Live Stock in the Tropics. Longman Group Ltd. London. 222-225.

Hartiko, H. 1998. Ekspresi Genetik dan Pengendaliannya. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. Hal 12-14.

Harwood, R.F. dan M.T. James. 1979. Entomology in Human and Animal Health. 7thEd. Macmillan Publishing Co., Inc. New York. 257-260.

Jawezt, J., L. Melnik dan E.A. Adeberg. 1991. Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan (Review of Medical Microbiology). Edisi 16. Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal 198-205.

Karnen, G.B. 2001. Imunologi Dasar. Edisi 4. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta. Hal 22-23.

Krafsur, E.S., Black IV, W.C., Church, C.J. dan Barnes, D.A. 1985. Age Structur and Reproductive Biology of Natural House Fly (Diptera : Muscidae). Popul. Enveron.Entomol., 14: 159-164.

Kresna, S.B. 2001. Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 56-57, 73-76, 182-184.

Levine. 1990. Parasitologi Veteriner. Diterjemahkan oleh Gatut Ashadi. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 214, 417- 424.

————, and Levine, M.M. 1991. Houseflies (*Musca domestica*) as Mechanical Vector of Shigellosis. Infect. Immun., 31, 445-452.

Muchlis, A. dan S. Partoutomo. 1971. Pemakaian Asuntol dalam Pengobatan Cascado dan Myiasis kuku pada Sapi. *Bull. LPPH* 2 : 1-5.

————, 1973. A Short Report on The Use of Asuntol Rointment in The Treatment of Cascado and Hoof Myiasis. *Vet. Med. Review* 2: 134-135.

Mufasirin, P. Hastutiek, N.D.R. Lastuti. 2004. Isolasi dan Identifikasi Protein Feromon Seks *Musca domestica* Betina sebagai Bahan Atractan untuk Pengendalian Lalat Rumah. Laporan Penelitian Dasar Dikti. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya.

Murtijo, B.A. 1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ayam. Penerbit Kanisius Yokyakarta. 98-101.

Noel, M.J.R. dan R. Krieg. 1993. Microbiology Concepts and Application. MC. Grow-Hill, Inc. USA. P 501-510.

Norris, J.R. dan A.K. Varma. 1992. Method In Microbiology Vol 24. Academic Press Inc. San Diego. P 101-105.

Partoutomo, S. 2000. Epidemiologi dan Pengendalian Myiasis di Indonesia. Wartazoa 10 : 20-27.

Rahayu, S.A. 1988. Biosintesa RNA Pada Organisme Eukariotik. PAV Bioteknologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. P 8-26.

Rantam F.A. 2003. Metode Imunologi. Airlangga University Press. Surabaya.

Richard, O.W. dan R.G. Davies. 1977. Imm's General Textbook of Entomology. Including Clasification and Biology. 10th Ed. The English Language Book Society and Chapman and Hall Ltd.

Riding, G., S. Muharsini, R. Pearson, Sukarsih, E., Satria, G. Wijffels, dan P. Willadsen. 2000. Fractionation, Identification and Vaccination Efficacy of Native Antigen from The Srewworm Fly, *Chrysomyia bezziana*. J. Ilmu Ternak Vet. (Edisi Khusus). 5 : 150-159.

Roitt, I., M. Jonathan, Brostatt, dan D.K. Male.1993. Microbiology Moleculer. Mosby Year Book. Europe Limited. P 17-18.

Roitt, I. 1997. Essential Immunology. 9th Ed. Blackweel Scince. Australia.

Sasmita, R., P. Hastutiek, Kismiyati, G. Mahasri dan R.N. Wahyuti. 2000. Bahan Ajar Entomologi Veteriner. Lab. Entomologi dan Protozoologi Fakultas Kedokteran Hewan. UNAIR. Surabaya.

Savitri, D. dan D. Sjamsulhadi. 1998. Kasus myiasis di Kabupaten Garut. Laporan Dinas Peternakan Tingkat II Kabupaten Garut. Garut, Jawa Barat.

Sehgal R, H.P.S. Bhatti, D.K. Bhasin, A.K. Sood, S. Nada, N. Malla dan K. Singh. 2002. Intestinal Myiasis Due to Musca domestica: A Report of Two Cases. J. Jpn. Infect. Dis. 55 : 191-193.

Sembiring, D.K. 1991. Kasus Myiasis (Srewworm) yang Berhasil Diamati di Kabupaten Wajo, Sulawesi Selatan. Laporan Dinas Peternakan Kabupaten Tingkat II Wajo, Sulawesi Selatan.

Shauff, M.E. 2001. Collecting and Preserving Insect and Mite : Technique and Tolls. Systematic Entomology Laboratory, USDA. National Museum of Matural History, NHB 168. Washington, D.C. 20560.

Sigit, S.H. 1978. Masalah Myiasis pada sapi di Sulawesi Selatan. Media Veteriner. 3 :1-12.

————, dan S. Partoutomo 1981. Myiasis in Indonesia. *Bull. Off. Int. Epiz.* 93: 173-178.

Smith, J.R. 1995. Produksi Serum Hiperimmun. Dalam : Teknologi ELISA Dalam Diagnosis dan Penenlitian (Bugress, G. W. Ed). Gadjah Mada University, press. Hal. 20, 23-24, 28-30.

Soulsby, E.J.L. 1986. Helminth, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animal. 7th Ed. Bailere Tindall, London.

Spradbery. J.P., D.P.A. Sands, dan P. Bakker. 1976. Evaluation of Insectiside Smears for The Control of Screwworm Fly *C. bezziana* in Papua New Guinea. *Aust. Vet. J.* 52: 280-284.

————, R.S. Tozer, dan A.A. Pond. 1983. The Efficacy of Some Acaricides Againts Screwworm Fly larvae. *Aust. Vet. J.* 60: 57-58.

————————, N. Drewett dan M.J. Lindsey. 1985. The Efficacy of Ivermectin Againts Larvae of Screwworm Fly (*C. bezziana*). *Aust. Vet. J.* 62: 311-314.

Sudjadi. 1988. Metode Pemisahan. Penerbit Kanisius. Yokyakata

Sukarsih, R.S. Tozer, and M.R. Knox. 1989. Collection and Case Incidence of Old World Screwworm Fly, *Chrysomya bezziana*, in Three Localities in Indonesia. Penyakit Hewan 21 : 114-117.

————, S. Partoutomo, G. Wijffels, R. Tozer, E. Satria, dan G. Riding. 2000. Establishment and Maintenance of A Coloni of The Old World Screwworm Fly, *C. bezziana* at Balitvet in Bogor, West Java, Indonesia. J. Ilmu Ternak Vet. 5 : 144-149.

————————————, T. Vuocolo dan P. Willadsen. 2000. Vaccination Trial in Sheep Againts *Chrysomya bezziana* Larvae Using The Recombinant Peritrophin Antigens Cb 15, Cb 42 and Cb 48. J. Ilmu Ternak. 5 : 192-196.

Sumitro, B.S., S. Rahayu, Fathiyah, S. Widyarti, E. Arumingtyas. 1998. Kursus Teknik-teknik Dasar Analisis Protein dan DNA. Jurusan Biologi. FMIPA. Universitas Brawijaya. Malang.

Tellman R.L. dan C.H. Eiseman. 1998. Inhibition of Growth of *Lucillia cuprina* Larvae Using Serum from Sheep Vaccinated with First-Instar Larvae Antigen. Int. J. Parasitol. 28 : 439-450.

Tizzard.I.R.1982. Pengantar Imunologi Veteriner. Airlangga University Press.

————. 1987. Veterinary Immunology An Introduction 3rd Edition. Saunder Company. USA. P 25-47.

————. 1988. Pengantar Imunologi Veteriner (Terjemahan: Masduki Partodiredja). Edisi kedua. Airlangga University Press. Surabaya. Hal 10-12 dan 46.

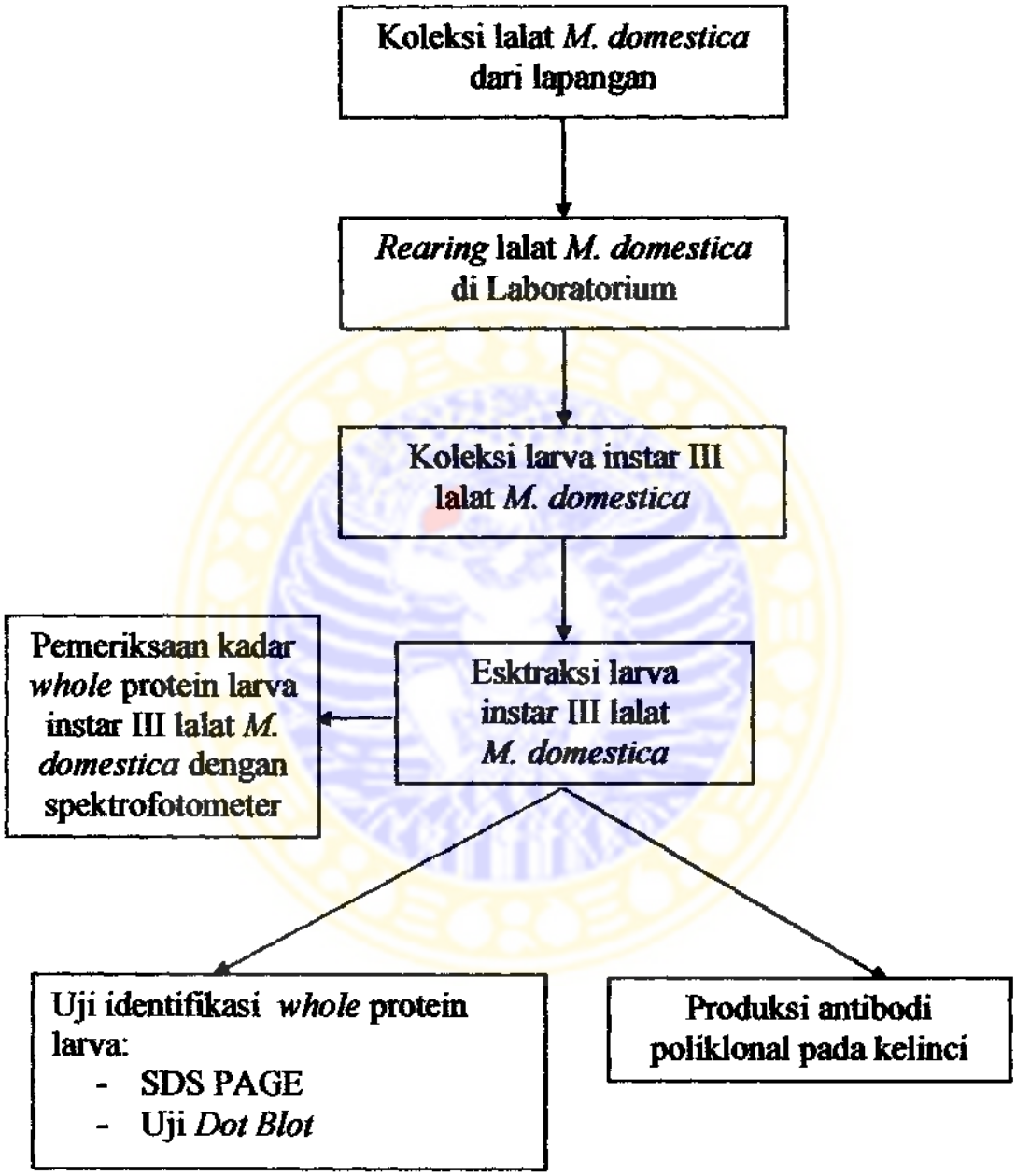
Turner, R.J. 1994. Imunnology A Comparative Approach. John Willey and Son's Ltd. Buffers Lane Chichester Mess Sussex PO1911UD Inc. USA. P203-206.

Vilk, W.A. 1992. Basic Microbiology 7th Ed. Harper Collins Publisher Inc. USA. P 267-277.

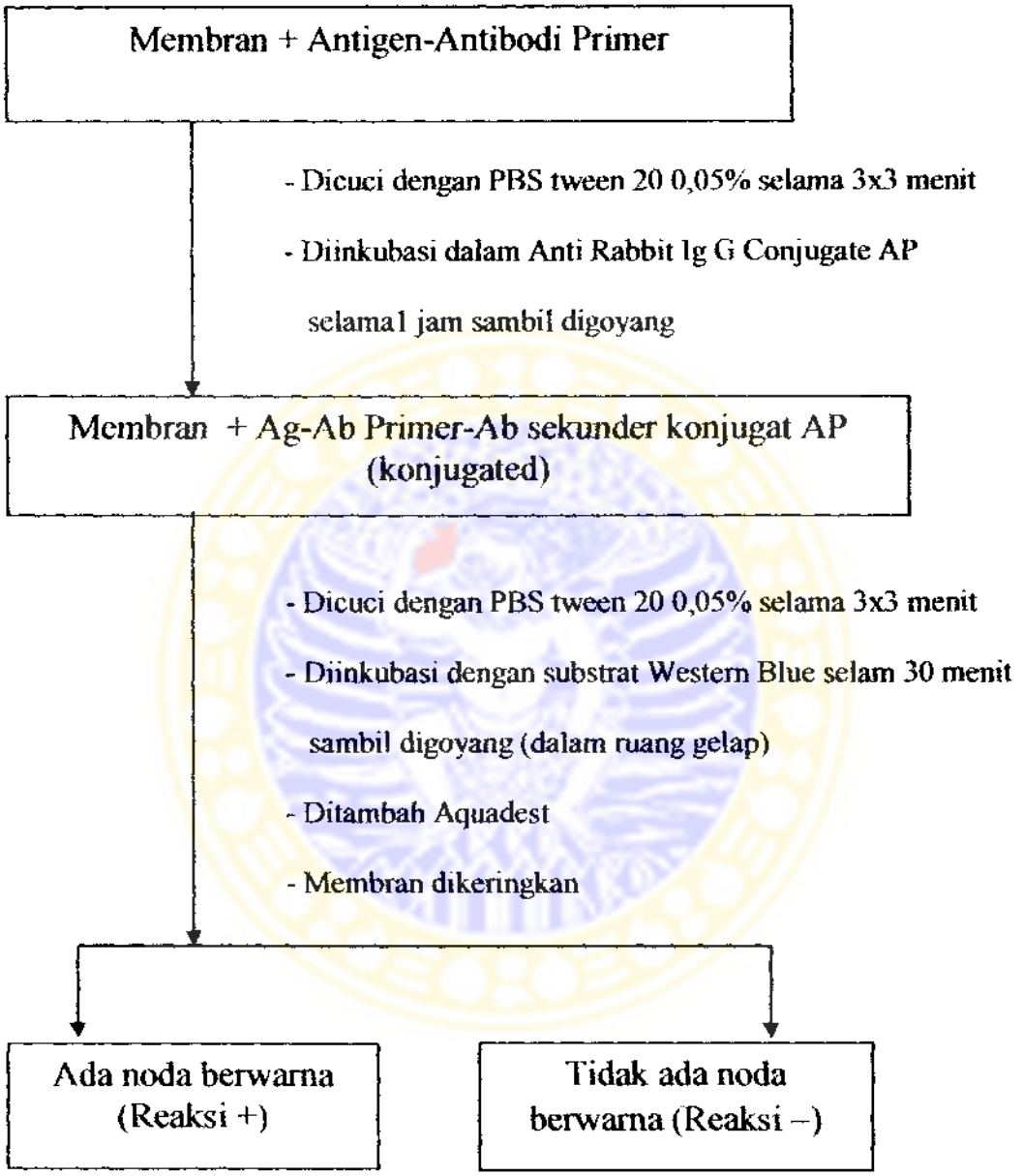
Wahab, A.S. dan S. Noerjati. 1993. Imunologi III. Gadjah Mada Press. Yogyakarta. Hal 45-49.

Wardhana, A.H., S. Muharsini dan Suhardono. 2003. Metode Pengawetan Larva dan Lalat Dewasa *Chrysomya bezziana* untuk Analisis DNA Mitokondria. J. Ilmu Ternak dan Vet. 8 : 264-275.

Lampiran. 1 **Diagram Alir Metode dan Operasional Penelitian**



Lampiran. 2 **Diagram Alir Uji *Dot Blot Whole* Protein Larva Instar III Lalat *M. domestica***



Lampiran 3. **Cara Kerja (Prosedur) *Dot Blot***

1. Siapkan kertas membran nitroselulose (NCM) ukuran 2x8 cm, buat petak 1x1 cm kemudian dibasahi dalam TBS (0,02 M Tris-HCl; 0,5 M NaCl; PH 7,5) selama 15 menit dan keringkan selama 5 menit.
2. Ambil antigen dari protein larva sebanyak 2 µl taruh dalam tabung eppendorf kemudian diencerkan dengan PBS 2^0-2^{-7} dan dari masing-masing tabung eppendorf ambil 2 µl teteskan pada petak-petak pada kolom I. Pada kolom II antigen tidak diencerkan.
3. Inkubasikan pada suhu ruang, kemudian cuci selama 3x5 menit dengan TBS Tween (TBS 0,05% Tween 20).
4. Blocking dengan 1% BSA dalam TBS tween 5%.
5. Inkubasi 1 jam dalam suhu ruang atau 24 jam pada suhu 4° C.
6. Cuci NCM dengan TBS tween 0,05% tiga kali, masing-masing selama 10 menit dengan shaker.
7. Potong membran nitroselulose pada kolom I sedangkan kolom II potong perpetak.
8. Pada kolom I ditambahkan antibodi primer dari serum kelinci dengan titer antibodi tertinggi (pemanenan serum kelinci pada booster ke-8) yang tidak diencerkan. Untuk (NCM) kolom II tambahkan antibodi primer dengan cara; buat pengenceran serum dengan buffer inkubasi (PBS) diencerkan 1/40, 1/80 sampai 1/5120.

9. Letakkan masing-masing petak NCM kolom II pada serum yang diencerkan.
10. Inkubasi pada suhu ruang dengan shaker selama satu jam.
11. Cuci NCM dengan TBS tween 0,05% tiga kali, masing-masing 10 menit dengan shaker.
12. Tambahkan antibodi sekunder (konjugat) dalam buffer inkubasi (PBS I).
13. Inkubasi dalam suhu ruang dengan shaker selama satu jam.
14. Cuci NCM dengan TBS tween 0,05% tiga kali, masing-masing 10 menit dengan shaker.
15. Tambahkan subtrat dan inkubasi pada suhu kamar di ruang gelap dengan penggoyangan sampai terlihat warna (hasil)
16. Stop reaksi dengan memindahkan NCM kedalam aquabidest non deionized.
17. Keringkan NCM pada suhu ruang dan hasil siap dianalisis. Peralatan dan bahan-bahan yang digunakan dalam uji *dot blot* dapat dilihat pada (Gambar 12 dan Gambar 13).

Lampiran 4. **Cara Kerja Teknik ELISA (Deteksi Antibodi)**

1. Mikroplate diisi dengan antigen (protein) dengan konsentrasi 10 µl/ml, masing-masing sumuran diisi 100 µl.
2. Inkubasi dalam waterbath suhu 37 °C semalam.
3. Cuci dengan buffer washing tiap sumuran 200 µl, sebanyak 3 kali.
4. Blocking dengan BSA (Cremer 4 %) dalam PBS I tiap sumuran 200 µl.
5. Inkubasi dalam waterbath suhu 37 °C selama 1 jam.
6. Cuci dengan buffer washing tiap sumuran 200 µl, sebanyak 3 kali.
7. Tanbahkan serum (sampel) sebanyak 100 µl tiap sumuran (pengenceran yang diinginkan). Larutan diencerkan dalam buffer inkubasi/PBS I.
8. Inkubasi dalam waterbath suhu 37 °C selama 1 jam.
9. Cuci dengan buffer washing tiap sumuran 200 µl, sebanyak 3 kali.
10. Tambahkan antibodi sekunder (conjugate) tiap sumuran 150 µl.
11. Inkubasi dalam waterbath pada suhu 37 °C selama 1 jam.
12. Cuci dengan buffer washing tiap sumuran 200 µl, sebanyak 3 kali.
13. tambahkan substrat tiap sumuran 150 µl.
14. Inkubasi dalam waterbath suhu 37 °C selama 5-15 menit sampai terlihat kuning.
15. Tambahkan larutan penyetop (NaOH 1 N) pada tiap sumuran sebanyak 50 µl.
16. Baca pada ELISA reader.

Lampiran 5. **Hasil ELISA Antibodi Poliklonal Protein Larva Instar III Lalat *M. domestica***

Tabel 2. Hasil ELISA Serum Protein Larva *M. domestica*

Model 680 Mikroplate Reader S/N 13998
Raw data report
27/09/2005 16:43:23
Lab. Name : Bio-Rad Laboratories
Kit name : End point # 01
Reading mode : Single
Measurement Filter : 415 nm (1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.027	0.028	0.030	0.029	0.033	0.029	0.031	0.033	0.027	0.028	0.031	0.029
B	0.024	0.848	1.295	2.010	1.845	1.814	1.443	1.622	1.415	2.018	0.104	0.024
C	0.037	0.541	1.026	1.408	1.330	1.616	1.538	2.195	1.681	1.704	0.096	0.029
D	0.027	0.444	0.678	1.055	1.699	1.574	1.527	1.922	1.719	1.097	0.095	0.210
E	0.031	0.628	0.785	1.201	1.877	1.067	1.355	1.013	1.495	1.648	0.101	0.024
F	0.029	0.371	0.525	1.131	1.242	1.140	1.274	1.338	0.918	1.429	0.090	0.031
G	0.027	0.277	0.438	0.853	1.671	0.177	1.276	1.104	0.943	1.248	0.090	0.034
H	0.029	0.042	0.030	0.026	0.029	0.025	0.026	0.031	0.026	0.028	0.027	0.029

Keterangan :

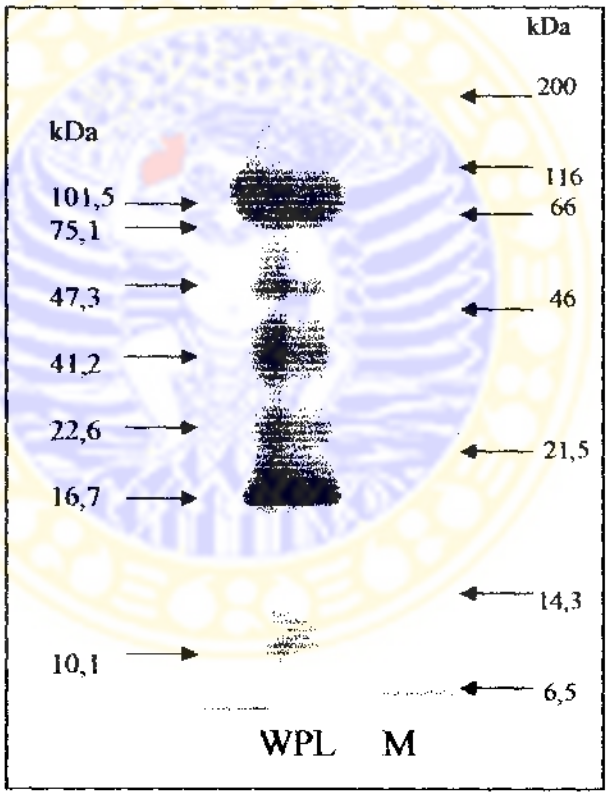
Kolom : 2 = kontrol
3 = booster 1
4 = booster 2
5 = booster 3
6 = booster 4
7 = booster 5
8 = booster 6
9 = booster 7
10 = booster 8
11 = booster 9

Kelinci 1 : B = Pengenceran 10
C = Pengenceran 20
D = Pengenceran 40

Kelinci 2 : E = Pengenceran 10
F = Pengenceran 20
G = Pengenceran 40

Lampiran. 6 **Hasil Fraksinasi Protein dengan SDS-PAGE 12%**

Hasil fraksinasi *whole* protein larva *M. domestica* dengan menggunakan SDS PAGE 12 %, berupa separasi molekul berdasarkan berat fraksi-fraksi protein yang tampak pada gel polyacrylamid. Dari perhitungan dengan membandingkan fraksi-fraksi protein dengan standart marker telah didapatkan 7 fraksi protein: 101,5 kDa, 75,1 kDa, 45,3 kDa, 41,2 kDa, 22,6 kDa, 16,7 kDa dan 10,1 kDa. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 10. Hasil Elektroforesis *Whole* Protein Larva *M. domestica* dengan SDS-PAGE 12% Pewarnaan Perak Nitrat ($AgNO_3$)

Keterangan : M = Marker ; WPL = *Whole* protein larva

Lampiran 7. **Cara Kerja (Prosedur) SDS PAGE 12 % (*Sodium Deodecyl Sulphonate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)**

Penentuan Berat Molekul dengan Elektroforesis SDS-PAGE 12 %

1. Siapkan semua bahan yang diperlukan :

Acrylamid	Tris HCL pH 8,8
Tris HCL pH 6,8	SDS 0,5 %
Aquadest	Temed
APS 10 % 4 °C	E. Buffer
Methanol 50 %	Asam Asetat 7,5 %
Glutaraldehid 10 %	NAOH 0,36 %
NH3	AgNo3
Formaldehid	Zitrnesoure 5 %
Butanol	

2. Membuat running gel

Bahan :	Acrylamid	2,5 ml
	Tris HCL pH 8,8	1,2 ml
	SDS 0,5 %	1, 2 ml
	Aquadest	1,1 ml
	Temed	5,0 ul
	APS 10 %	30 µl.

Cara Kerja : Masukkan lewat dinding kaca sampai 1 cm dari atas, tambahkan Butanol diatasnya sampai penuh. Fungsi Butanol adalah untuk meratakan permukaan running gel.

3. Membuat stacking gel.

   Bahan : Acrylamid 0,66 ml

   Tris HCL pH 6,8 0,8 ml

   SDS 0,5 % 0,8 ml

   Aquadest 0,8 ml.,

   Temed 4,0 µl

   APS 10 % 20 ul.

   Cara Kerja : Masukkan keatas cetakan running gel sampai penuh kemudian masukkan comb ke stacking gel dan inkubasi selama 25 menit.

4. Siapkan sampel (Laemli buffer + sampel) masukkan ke dalam ependorf
5. Tutup ependorf ditusuk dengan jarum setengah tusukan, langsung direbus pada suhu 100 °C selama 5 menit.
6. Setelah inkubasi selesai lepaskan comb dan cuci dengan E buffer 1 kali.
7. Masukkan cetakan tadi ke Biometra, tuangi dengan E buffer 1 kali (kira-kira 800 ml). Hilangkan gelumbung pada lubang dengan cara menusukkan dengan jarum.
8. Masukkan sampel kedalam lubang comb. Pasang listrik dengan voltase 125 V dan 40 mA.
9. Tunggu sampai sampel turun seluruhnya.
10. Matikan listrik dan lepas gel pelan-pelan.
11. Tahap pencucian I :

    - Metanol 25 ml Asam asetat 3,75 ml

    Aquadest 72,25 ml goyang dengan kecepatan 42 x selama 30 menit.

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di bagian Parasitologi Laboratorium Entomologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Unair, Laboratorium Patologi Klinik Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Unair, Laboratorium Biologi Molekuler Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Waktu penelitian selama empat bulan mulai bulan Juli 2005 sampai dengan Oktober 2005.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Unit Analisis

Unit analisis yang digunakan dalam penelitian ini adalah *whole* protein larva instar III lalat *M. domestica*.

3.2.2 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah lalat *M. domestica* dewasa jantan dan betina yang diperoleh dari sekitar rumah, tempat sampah serta pasar dengan menggunakan perangkap lalat. Sampel dibawa ke Laboratorium Entomologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dibiakkan untuk dikoleksi larvanya. Larva yang dikoleksi kemudian dibersihkan dengan aquadest dan diberi PBS kemudian dibawa ke Laboratorium Patologi Klinik untuk kemudian diperiksa kadar proteinnya. Setelah diperiksa kadar proteinnya hasil dibawa ke Laboratorium Biologi Molekuler untuk dilakukan

serangkaian pemeriksaan antara lain: SDS-PAGE, ELISA dan *Dot Blot*. Namun dalam penelitian ini tidak dibahas pemeriksaan mengenai SDS-PAGE dan ELISA secara rinci. Hasil fraksinasi protein larva *M. domestica* dengan SDS-PAGE terdapat beberapa pita protein dengan berat molekul tertentu (Hasil diperoleh dengan membandingkan dengan *standart marker*). Hasil ELISA (Lampiran 5), tujuan pemberian lampiran hasil ELISA ini adalah sebagai patokan dalam uji *dot blot*. Pada Uji *dot blot* diperlukan persiapan alat dan bahan-bahan antara lain:

a. Alat-alat

Peralatan yang digunakan meliputi: *mikropipet multi channel, pipet tip, petridish, water bath, Shaker*, tabung eppendorf, gelas ukur, gunting atau *cutter*, pensil, penjepit pinset.

b. Bahan-bahan

Bahan-bahan yang diperlukan adalah Kertas *Membran Nitroselulose* (NCM); *Tris Buffer Saline* (TBS); *Bovine Serum Albumin* (BSA) 1%; *Tween* 0,05%; *Western Blue Substrat*, *aquadest*, *antigen* dari *whole* protein larva *M. domestica*, *Antibodi* dari serum hewan coba, *Ab Konjugat AP*.

3.3 Metode Penelitian

Metode dan langkah-langkah yang dilakukan dalam penelitian ini adalah:

1. *Rearing* lalat dan koleksi larva instar III lalat *M. domestica*
2. Isolasi *whole* protein larva instar III lalat *M. domestica*
3. Produksi antibodi poliklonal pada kelinci
4. Uji *dot blot whole* protein larva instar III lalat *M. domestica*

3.3.2 Isolasi *Whole* Protein Larva Instar III Lalat *M. domestica*

Sebanyak 100 ekor larva instar III lalat *M. domestica* dimasukkan ke dalam tabung *konikal* 15 ml dan dicuci tiga kali dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) sampai larva terlihat bersih kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm selama lima menit, setelah bersih ditambahkan empat ml PBS. Supernatan diambil disimpan pada suhu –20 °C dan siap untuk dilakukan fraksinasi protein. Konsentrasi protein diukur menggunakan spektrofotometer OD_{540}.

3.3.3 Produksi Antibodi poliklonal pada kelinci

Antibodi poliklonal dibuat dengan jalan menginjeksikan ekstrak larva (hasil isolasi) pada kelinci jantan lokal sehat sebanyak dua ekor. Immunisasi awal diberikan sebanyak 50-500 µg/ml protein larva dengan penambahan *complete freud's adjuvant* sama banyak. Penyuntikan dilakukan di bawah kulit pada empat lokasi tubuh yang mempunyai kulit longgar. Injeksi diulang dengan protein yang sama dengan penambahan *incomplete adjuvant* (sigma) pada dua minggu setelah penyuntikan pertama. Penyuntikan ulang (booster) berikutnya menggunakan protein yang sama dengan *incomplete adjuvant* dengan cara yang sama sebanyak sembilan kali hingga didapatkan titer antibodi yang tinggi. Sebelum dilakukan penyuntikan pertama dilakukan pengambilan serum sebagai kontrol negatif dalam uji ELISA. Pengambilan serum selanjutnya dilakukan sebelum penyuntikan ulang (booster). Tujuan pengambilan serum setiap sebelum penyuntikan ulang (booster) adalah untuk melihat respon antibodi setiap setelah penyuntikan dengan uji yang sama.

3.3.4 Uji *Dot Blot Whole* Protein Larva Instar III Lalat *M. domestica*

Uji *dot blot* dilakukan untuk pemeriksaan secara semikuantitatif pada uji immun untuk mendeteksi antigen. Sampel yang mengandung antigen diteteskan pada membran yang mengandung antibodi. Hal ini tidak dilakukan seperti pemeriksaan protein dengan metode SDS-PAGE yang antigennya terlihat pada gel yang tercetak berupa band-band dengan berat molekul tertentu. Pada uji *dot blot* antigen direaksikan dengan antibodi dan hasilnya akan terlihat adanya noktah-noktah atau *dot* dengan gradasi warna yang bervariasi. Gradasi warna yang bervariasi menunjukkan konsentrasi antigen bervariasi pula.

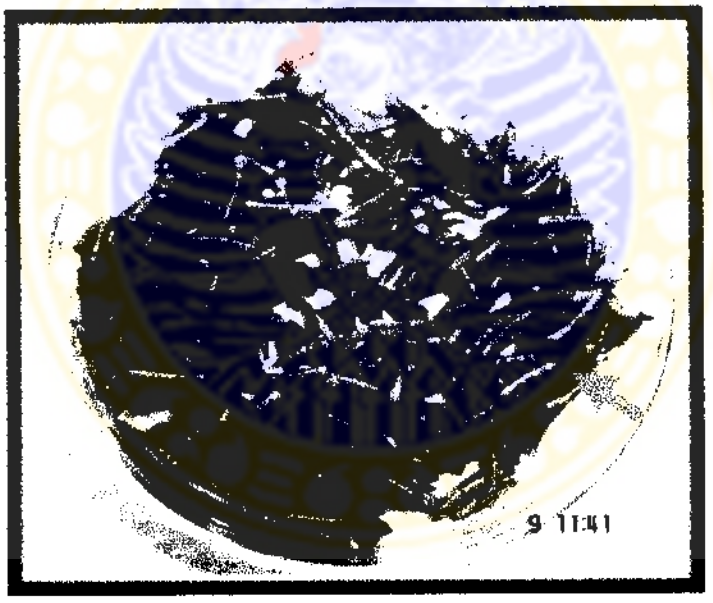
Prosedur *dot blot* dilakukan sebagai berikut: membran nitroselulose dipotong dengan ukuran 2x8 cm dan dibuat kotak-kotak sebesar satu sentimeter persegi dengan pensil dan dikerjakan di atas kertas saring atau tissue. Kemudian dibuat BSA yang diencerkan dengan TBS. *Dot* bulat dengan diameter 3-5 mm disesuaikan dengan tube kapiler. Dikeringkan di udara 15 menit atau tunggu sampai terlihat *wet spot*. Bloking membran dengan 25 ml BSA 1 % dalam TBS. diinkubasikan pada temperatur ruang, digerakkan dengan *shaker* 10 menit. Kemudian disimpan pada 4^0C setelah di transfer ke *buffer* TBS tanpa BSA. Kemudian HRP dan biotin yang dilabel antibodi disiapkan dalam TBT 1/500 dan 1/5000. *Dotted* dipotong dan bagi dua setelah itu dimasukkan dalam tabung plastik (*screw-capped*) 50 ml. Diinkubasikan semalam pada suhu 4^0C dengan cara menggerakkan dengan shaker atau taruhlah pada 4^0C dengan bagian *dotted* kontak dengan cairan, bukan dengan plastiknya. *Dotted* dicuci tiga kali dengan TBT 25 ml dengan cara menggerakkan 1-2 menit dengan *shaker* dan cepat buang setelah

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1 *Rearing* Lalat dan Koleksi Larva Instar III *M. domestica*

Rearing lalat *M. domestica* jantan dan betina menghasilkan telur dalam beberapa hari. Telur lalat *M domestica* menetas dan diperoleh larva instar I hingga larva instar III, kemudian larva Instar III dicuci dengan Phospat Buffer Salin (PBS) dan dikoleksi untuk dilakukan ektraksi *whole* protein larva, sebagian lainnya di*rearing* sampai dewasa.



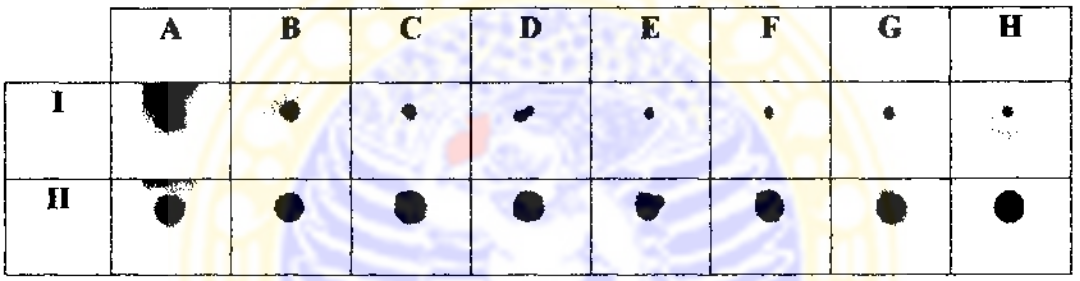
Gambar 8. Hasil Koleksi Larva Instar III Lalat *M. domestica*
Keterangan : Panah ungu (⁺)

4.2 Pengukuran Kadar *Whole* Protein Larva Instar III *M. domestica*

Hasil pengukuran ektraksi *whole* protein larva instar III lalat *M. domestica* diukur dengan alat spektrofotometer dengan OD_{540}, diketahui kadar proteinnya sebesar **0,53** μg/μl.

4.3 Karakterisasi *Whole* Protein Larva dengan *Dot blot*

Hasil uji *dot blot* menunjukkan bahwa antigen dari *whole* protein larva instar III lalat *M. domestica* berikatan dengan antibodi yang berasal dari serum hewan coba (kelinci). Hasil yang positif dapat terlihat dengan adanya noktah-noktah dengan warna yang cukup pekat. Gradasi warna menunjukkan konsentrasi antigen yang terdapat pada noktah. Semakin pekat maka konsentrasi antigen makin tinggi dan sebaliknya semakin terang maka konsentrasi antigen makin rendah. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 9. Hasil Uji *Dot Blot* Protein Larva Instar III Lalat *M. domestica*

Keterangan:

Baris I : **Antigen yang diencerkan** + Antibodi + Ab Konjugate AP

Kolom A = Pengenceran 2^{0} = 1
Kolom B = Pengenceran 2^{-1}= 1/2
Kolom C = Pengenceran 2^{-2} = 1/4
Kolom D = Pengenceran 2^{-3} = 1/8
Kolom E = Pengenceran 2^{-4} = 1/16
Kolom F = Pengenceran 2^{-5} = 1/32
Kolom G = Pengenceran 2^{-6} = 1/64
Kolom H = Pengenceran 2^{-7} = 1/128

Baris II : Antigen + **Antibodi yang diencerkan** + Ab Konjugate AP

Kolom A = Pengenceran 1/40
Kolom B = Pengenceran 1/80
Kolom C = Pengenceran 1/160
Kolom D = Pengenceran 1/320
Kolom E = Pengenceran 1/640
Kolom F = Pengenceran 1/1280
Kolom G = Pengenceran 1/2560
Kolom H = Pengenceran 1/5120

	A	B	C	D	E	F	G	H
K	—	—	—	—	—	—	—	—
I	+	+	+	+	+	+	+	+
II	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabel 1. Hasil Analisis Uji *Dot Blot* Protein Larva Instar III Lalat *M. domestica*

Keterangan:

K : **Kontrol (–)**
Baris I : **Antigen yang diencerkan** + Antibodi + Ab Konjugate AP
Kolom A-H : Pengenceran antigen = 2^0-2^{-7} (1 sampai 1/128)

Baris II : Antigen + **Antibodi yang diencerkan** + Ab Konjugate AP
Kolom A-H : Pengenceran antibodi = 1/40 sampai 1/5120

BAB V

PEMBAHASAN

5.1 *Rearing* Lalat dan Koleksi Larva Instar III *M. domestica*

Rearing lalat dilakukan dengan mengumpulkan lalat *M. domestica* untuk dipelihara. Pemeliharaan lalat ini dimaksudkan untuk mendapatkan larva instar III yang proteinnya digunakan sebagai sumber antigen yang akan dipakai dalam uji *dot blot*. Setelah beberapa hari lalat betina yang gravid meletakkan telurnya pada media feses dan telur-telur tersebut menetas menjadi larva instar I hingga larva instar III. Dalam penelitian ini digunakan larva instar III karena merupakan stadium larva yang dianggap paling sempurna dan memudahkan dalam pengkoleksian karena memiliki ukuran yang paling besar dari stadium larva yang lain. Pengkoleksian Larva instar III dilakukan dengan menggunakan penjepit pinset satu-persatu dan dikumpulkan pada cawan petri dan dicuci dengan Phospat Buffer Saline (PBS) tiga kali sampai bersih.

Menurut Wandhana dkk., (2003) pengawetan insekta yang baik adalah dengan cara membunuhnya dalam air panas kemudian disimpan dalam etanol 70-80%, metode ini dapat melindungi protein larva dan mencegah larva menjadi hitam. Sedangkan pengawetan dengan formalin menyebabkan jaringan larva menjadi rapuh sehingga tidak dianjurkan untuk keperluan analisis molekuler kecuali untuk keperluan pembuatan preparat histologik (Shauff, 2001). Larva yang sudah bersih kemudian diletakkan dalam tabung dan disimpan di dalam referigrator. Setelah itu larva yang dikoleksi diukur kadar proteinnya.

5.2 Pengukuran Kadar *Whole* Protein Larva Instar III *M. domestica*

Sekitar 100 ekor larva instar III *M. domestica* yang telah dikoleksi dimasukkan dalam tabung *konikal* 15 ml dan dicuci beberapa kali dengan PBS dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu 4 ^{0}C selama 5 menit, setelah bersih ditambahkan 4 ml PBS. Supernatan diambil dan dilakukan pengukuran kadar *whole* protein dari larva instar III lalat *M. domestica*. Pengukuran dapat dilakukan dengan cara hasil sentrifugasi larva diambil 1 µl diletakkan pada tabung baca dan diukur dengan alat spektrofotometer dengan OD_{540}, dan dapat diketahui kadar proteinnya sebesar **0,53** µg/µl. Pengukuran kadar protein ini dimaksudkan untuk mengetahui berapa kadar protein yang akan disuntikkan pada hewan coba. Pada prosedur imunisasi penyuntikan secara subkutan atau intramuskular menggunakan 50-500 µg antigen (Franks, 1988).

5.3 Karakterisasi *Whole* Protein Larva dengan *Dot blot*

Hasil uji *dot blot* protein larva *M. domestica* yang direaksikan dengan serum asal hewan coba (kelinci) menunjukkan adanya ikatan antigen-antibodi yang terlihat dengan *dot* atau noktah. Analisa protein larva *M. domestica* dengan konsentrasi antigen yang diencerkan (Baris I): 2^0, 2^{-1}, 2^{-2}, 2^{-3}, 2^{-4} ,2^{-5} ,2^{-6}, 2^{-7} menunjukkan hasil positif, dengan antibodi asal serum kelinci yang tidak diencerkan. Warna terlihat makin terang pada pengenceran antigen yang makin tinggi. Pada baris II antigen yang tidak diencerkan direaksikan dengan antibodi asal serum hewan coba (kelinci) yang diencerkan 1/40 sampai 1/5120 menunjukkan hasil yang sama dengan baris I (positif). Warna noktah terlihat

makin terang pada pengenceran yang makin tinggi. Hasil analisis uji *dot blot* ini seluruhnya positif dan dapat dikatakan bahwa protein larva *M. domestica* merupakan protein yang antigenik. (Hasil Pengamatan dan konfirmasi langsung dengan Bapak Mufasirin, M.Si., Drh).

Menurut Rantam, (2003) Gradasi warna menunjukkan adanya variasi konsentrasi antigen atau antibodi di dalam *dot* yang dideteksi. Konsentrasi antibodi yang makin tinggi menunjukkan warna yang semakin gelap sebaliknya makin rendah konsentrasi warna yang nampak akan semakin terang. Jadi *dot blots* hanya digunakan untuk mengetahui jenis antigennya bukan berat molekul proteinnya. Namun demikian estimasi konsentrasi antigen dapat diketahui pada *blots* tersebut.

Posisi antigen yang dicari dapat diidentifikasi pada membran dengan mereaksikannya pada antibodi spesifik yang bertanda atau dilabel dengan radioisotop. Antibodi yang telah dilabel tersebut akan menghasilkan bercak chemilunesen dan menunjukkan posisi kompleks antigen-antibodi yang dicari (Kresna, 2001).

Hasil dari penelitian ini, dengan adanya warna yang timbul menunjukkan bahwa terdapat ikatan antara antigen dengan antibodi, sehingga dapat disimpulkan bahwa antibodi pada serum kelinci dapat berikatan dengan protein larva *M. domestica* yang bersifat antigenik. Antibodi yang terbentuk adalah antibodi poliklonal yang dihasilkan oleh sistem imun kelinci.

Bellanti (1993), menyatakan bahwa parasit mengandung berbagai macam antigen, beberapa diantaranya adalah spesifik stadium dan bersifat

sementara dan yang lain tetap ada pada seluruh daur hidup parasit dan dapat merangsang terus-menerus respon imunologik yang berbeda.

Menurut Baratawidjaya (2000), bila antigen dimasukkan ke dalam sistem imun hewan coba, semua sel B yang mengenal *epitop* pada antigen akan dirangsang untuk memproduksi antibodi. Darah yang diambil dari hewan tersebut akan mengandung antibodi yang multipel dan akan bereaksi dengan setiap epitop. Serum tersebut disebut poliklonal karena mengandung produk dari banyak sel B. Keuntungan antibodi poliklonal dibandingkan dengan antibodi monoklonal adalah lebih sensitif dalam mengenal antigen walaupun spesifitasnya lebih rendah (Tizzard, 1982).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Hasil uji *dot blot* menunjukkan positif secara keseluruhan hal tersebut terlihat dari noktah-noktah yang timbul pada kertas membran nitroselulose (NCM) yang tampak dengan gradasi warna noktah yang cukup pekat. Hasil analisis noktah yang terlihat maka dapat diambil kesimpulan bahwa protein larva lalat *M. domestica* bersifat antigenik.

6.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang protein larva *M. domestica* secara kuantitatif melalui uji *western blot* untuk mengetahui berat molekul dari protein larva yang bersifat antigenik serta pemurnian protein melalui pemeriksaan kromatografi.

RINGKASAN

Benny Aprissa Surya P. Identifikasi Protein Antigenik Larva Instar III Lalat Rumah (*M. domestica*) dengan Uji *Dot Blot*. Penelitian ini di bawah bimbingan Bapak Benyamin Chr. Tehupuring, MSi., Drh. selaku Dosen Pembimbing Pertama dan Bapak Dr. Hardijanto, MS., Drh. selaku Dosen Pembimbing Kedua.

Penelitian ini dilakukan untuk menjawab permasalahan apakah dengan uji *dot blot whole* protein larva instar III lalat *M. domestica* menunjukkan sifat antigenik, serta bertujuan untuk mengidentifikasi apakah *whole* protein larva instar III lalat *M. domestica* bersifat antigenik melaui uji *dot blot*.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Entomologi bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Unair, Laboratorium Patologi Klinik Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Unair, Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Di dalam penelitian ini dilakukan beberapa metode penelitian yaitu: 1. *Rearing* Lalat dan Koleksi Larva Instar III Lalat *M. domestica*, 2. Isolasi *whole* protein larva instar III lalat *M. domestica*, 3. Produksi antibodi poliklonal pada kelinci, 4. Uji *dot blot whole* protein larva instar III lalat *M. domestica*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar *whole* protein larva instar III lalat *M. domestica* hasil ekstraksi dengan alat spektrofotometer dengan OD_{540} adalah 0,53 μg/μl. Hasil Uji *dot blot* secara keseluruhan positif. Hal tesebut terlihat dari timbulnya noktah pada kertas membran nitroselulose (NCM) dengan

gradasi warna yang cukup pekat hingga pengenceran tertinggi, hal itu berarti antigen dari protein larva dapat berikatan dengan antibodi dari serum kelinci.

Berdasarkan hasil uji *dot blot* ini memberikan bukti bahwa protein larva instar III lalat *M. domestica* bersifat antigenik dan dapat menimbulkan respon imun pada hewan coba maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yang diarahkan untuk pengembangan vaksin yang sesuai dan protektif untuk optimalisasi pencegahan dan pengendalian kasus *myiasis* di lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

Abbas, A.K., M.L. Andrew dan J. Pober. 1991. Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunder Company. USA. P 37-40.

Anonimus[a], 2002. Leptospira Bifleksa Ig M Detection by Dot Blot Arum Laboratories. Chipeta Way. Salt Lake City. UT. P1-3.

Axtell, R.C. dan J.J. Arends. 1990. Ecology and Management of Arthropods Pest of Poultry. Ann.Vet. Entomol., 35, 101-126.

Baratawidjaya, K.G. 2000. Immunologi Dasar. Edisi keempat. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 22-37, 151-158.

————, 2002.Immunologi Dasar. Edisi kelima. Balai Penerbit Fakultas kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Hal. 13, 29, 33 dan 36.

Bellanti, J.A. 1993. Immunologi III (Terjemahan A.S. Wahab) Gajah Mada University Press. Yokyakarta.

Canyon, D.A. 1999. Review of the *Musca domestica* and *Stomoxys calsitrans* (Diphtera : Cullicidae). Townsville Qld. Autralia.

Casu, R., C. Eisemann, R. Pearson, G. Riding, I. East, A. Dinaldson, L. Cadogan dan R.Tellam. 1997. Antibody-mediated Inhibitian of The Growth of Larvae from an Insect Causing Cutaneus Myiasis in a Mammalia host. Proc. of The National Academy of Sciences of The United States of America. 94 : 8939-8944.

Chapman, J.W. dan Goulson, D. 2000. Environmental Versus Genetic Influences on Fluctuating Asymmetry in The House Fly, *Musca domestica*. Biol. J. Linn, 70, 403-413.

Clarke, G.M. 1991. Report on A sterile Insect Release Trials for Control of The Old World Screwworm Fly *Chrysomya bezziana* in Papua New Guine. Aust. Vet. J. 68 : 277-279.

Crighton, D.B., 1984. Immunological Aspect of Reproduction in Animals. Robert Hortnall Ltd. England. P 27-28.

Dharmawati, A. 2005. *Rearing* (Perkembangbiakan) Larva Lalat Rumah (*Musca domestica*, Linneus) pada Beberapa Media Feses Ternak Di Laboratorium. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Driyer, R.L. 1993. Biokimia Suatu Pendekatan Berorientasi Kasus. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. Hal 45-51.

East, I.J., C.J. Fitzgerald, R.D. Pearson, R.A. Donaldson, T. Vuocolo, L.C. Cadogan, R.L.Tellam, dan C.H. Eiseman.1993. *Luclilia cuprina* : Inhibition of Larval Growth Induced by Immunization of Host Sheep with Extracts of Larval Peritropic Membrane. Int. J. Parasitol. 23 : 221-229.

Ediwan. 1998. Data tentang myiasis di BPPH III Bandar Lampung. Balai Penyidikan Penyakit Hewan Wilayah III, Bandar Lampung.

Elvin, C.M., T. Vuocolo, R. Pearson, I.J. East, G. Riding, C. Eismann, dan R.L. Tellam. 1996. Characterization of Major Peritrophic Membrane Protein, Perithropin-44, From The Larvae of *Lucilia cuprina*; cDNA and Deduced Amino Acid Sequences. *J. Biol. Chem.* 271: 8925-8935.

Frandson. 1992. Anatomy and Phisiology of Farm Animal 4th Ed. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. P 23-25.

Frank, F.1998. Characterization of Protein. Pafra Ltd. United Kingdom. 415-425.

Greenberg, B. 1973. Flies and Disease. Biology Disease Transmission. New Jersey: Univ. Press Princeton.v.2.

Hall, H.T.B. 1972. Disease and Parasitic Live Stock in the Tropics. Longman Group Ltd. London. 222-225.

Hartiko, H. 1998. Ekspresi Genetik dan Pengendaliannya. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. Hal 12-14.

Harwood, R.F. dan M.T. James. 1979. Entomology in Human and Animal Health. 7thEd. Macmillan Publishing Co., Inc. New York. 257-260.

Jawezt, J., L. Melnik dan E.A. Adeberg. 1991. Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan (Review of Medical Microbiology). Edisi 16. Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal 198-205.

Karnen, G.B. 2001. Imunologi Dasar. Edisi 4. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta. Hal 22-23.

Krafsur, E.S., Black IV, W.C., Church, C.J. dan Barnes, D.A. 1985. Age Structur and Reproductive Biology of Natural House Fly (Diptera : Muscidae). Popul. Enveron.Entomol., 14: 159-164.

Kresna, S.B. 2001. Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 56-57, 73-76, 182-184.

Levine. 1990. Parasitologi Veteriner. Diterjemahkan oleh Gatut Ashadi. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 214, 417- 424.

————, and Levine, M.M. 1991. Houseflies (*Musca domestica*) as Mechanical Vector of Shigellosis. Infect. Immun., 31, 445-452.

Muchlis, A. dan S. Partoutomo. 1971. Pemakaian Asuntol dalam Pengobatan Cascado dan Myiasis kuku pada Sapi. *Bull. LPPH* 2 : 1-5.

————, 1973. A Short Report on The Use of Asuntol Rointment in The Treatment of Cascado and Hoof Myiasis. *Vet. Med. Review* 2: 134-135.

Mufasirin, P. Hastutiek, N.D.R. Lastuti. 2004. Isolasi dan Identifikasi Protein Feromon Seks *Musca domestica* Betina sebagai Bahan Atractan untuk Pengendalian Lalat Rumah. Laporan Penelitian Dasar Dikti. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya.

Murtijo, B.A. 1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ayam. Penerbit Kanisius Yokyakarta. 98-101.

Noel, M.J.R. dan R. Krieg. 1993. Microbiology Concepts and Application. MC. Grow-Hill, Inc. USA. P 501-510.

Norris, J.R. dan A.K. Varma. 1992. Method In Microbiology Vol 24. Academic Press Inc. San Diego. P 101-105.

Partoutomo, S. 2000. Epidemiologi dan Pengendalian Myiasis di Indonesia. Wartazoa 10 : 20-27.

Rahayu, S.A. 1988. Biosintesa RNA Pada Organisme Eukariotik. PAV Bioteknologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. P 8-26.

Rantam F.A. 2003. Metode Imunologi. Airlangga University Press. Surabaya.

Richard, O.W. dan R.G. Davies. 1977. Imm's General Textbook of Entomology. Including Clasification and Biology. 10th Ed. The English Language Book Society and Chapman and Hall Ltd.

Riding, G., S. Muharsini, R. Pearson, Sukarsih, E., Satria, G. Wijffels, dan P. Willadsen. 2000. Fractionation, Identification and Vaccination Efficacy of Native Antigen from The Srewworm Fly, *Chrysomyia bezziana*. J. Ilmu Ternak Vet. (Edisi Khusus). 5 : 150-159.

Roitt, I., M. Jonathan, Brostatt, dan D.K. Male.1993. Microbiology Moleculer. Mosby Year Book. Europe Limited. P 17-18.

Roitt, I. 1997. Essential Immunology. 9th Ed. Blackweel Scince. Australia.

Sasmita, R., P. Hastutiek, Kismiyati, G. Mahasri dan R.N. Wahyuti. 2000. Bahan Ajar Entomologi Veteriner. Lab. Entomologi dan Protozoologi Fakultas Kedokteran Hewan. UNAIR. Surabaya.

Savitri, D. dan D. Sjamsulhadi. 1998. Kasus myiasis di Kabupaten Garut. Laporan Dinas Peternakan Tingkat II Kabupaten Garut. Garut, Jawa Barat.

Sehgal R, H.P.S. Bhatti, D.K. Bhasin, A.K. Sood, S. Nada, N. Malla dan K. Singh. 2002. Intestinal Myiasis Due to Musca domestica: A Report of Two Cases. J. Jpn. Infect. Dis. 55 : 191-193.

Sembiring, D.K. 1991. Kasus Myiasis (Srewworm) yang Berhasil Diamati di Kabupaten Wajo, Sulawesi Selatan. Laporan Dinas Peternakan Kabupaten Tingkat II Wajo, Sulawesi Selatan.

Shauff, M.E. 2001. Collecting and Preserving Insect and Mite : Technique and Tolls. Systematic Entomology Laboratory, USDA. National Museum of Matural History, NHB 168. Washington, D.C. 20560.

Sigit, S.H. 1978. Masalah Myiasis pada sapi di Sulawesi Selatan. Media Veteriner. 3 :1-12.

————, dan S. Partoutomo 1981. Myiasis in Indonesia. *Bull. Off. Int. Epiz.* 93: 173-178.

Smith, J.R. 1995. Produksi Serum Hiperimmun. Dalam : Teknologi ELISA Dalam Diagnosis dan Penenlitian (Bugress, G. W. Ed). Gadjah Mada University, press. Hal. 20, 23-24, 28-30.

Soulsby, E.J.L. 1986. Helminth, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animal. 7th Ed. Bailere Tindall, London.

Spradbery. J.P., D.P.A. Sands, dan P. Bakker. 1976. Evaluation of Insectiside Smears for The Control of Screwworm Fly *C. bezziana* in Papua New Guinea. *Aust. Vet. J.* 52: 280-284.

————, R.S. Tozer, dan A.A. Pond. 1983. The Efficacy of Some Acaricides Againts Screwworm Fly larvae. *Aust. Vet. J.* 60: 57-58.

————————, N. Drewett dan M.J. Lindsey. 1985. The Efficacy of Ivermectin Againts Larvae of Screwworm Fly (*C. bezziana*). *Aust. Vet. J.* 62: 311-314.

Sudjadi. 1988. Metode Pemisahan. Penerbit Kanisius. Yokyakata

Sukarsih, R.S. Tozer, and M.R. Knox. 1989. Collection and Case Incidence of Old World Screwworm Fly, *Chrysomya bezziana*, in Three Localities in Indonesia. Penyakit Hewan 21 : 114-117.

————, S. Partoutomo, G. Wijffels, R. Tozer, E. Satria, dan G. Riding. 2000. Establishment and Maintenance of A Coloni of The Old World Screwworm Fly, *C. bezziana* at Balitvet in Bogor, West Java, Indonesia. J. Ilmu Ternak Vet. 5 : 144-149.

————————, T. Vuocolo dan P. Willadsen. 2000. Vaccination Trial in Sheep Againts *Chrysomya bezziana* Larvae Using The Recombinant Peritrophin Antigens Cb 15, Cb 42 and Cb 48. J. Ilmu Ternak. 5 : 192-196.

Sumitro, B.S., S. Rahayu, Fathiyah, S. Widyarti, E. Arumingtyas. 1998. Kursus Teknik-teknik Dasar Analisis Protein dan DNA. Jurusan Biologi. FMIPA. Universitas Brawijaya. Malang.

Tellman R.L. dan C.H. Eiseman. 1998. Inhibition of Growth of *Lucillia cuprina* Larvae Using Serum from Sheep Vaccinated with First-Instar Larvae Antigen. Int. J. Parasitol. 28 : 439-450.

Tizzard.I.R.1982. Pengantar Imunologi Veteriner. Airlangga University Press.

————. 1987. Veterinary Immunology An Introduction 3rd Edition. Saunder Company. USA. P 25-47.

————. 1988. Pengantar Imunologi Veteriner (Terjemahan: Masduki Partodiredja). Edisi kedua. Airlangga University Press. Surabaya. Hal 10-12 dan 46.

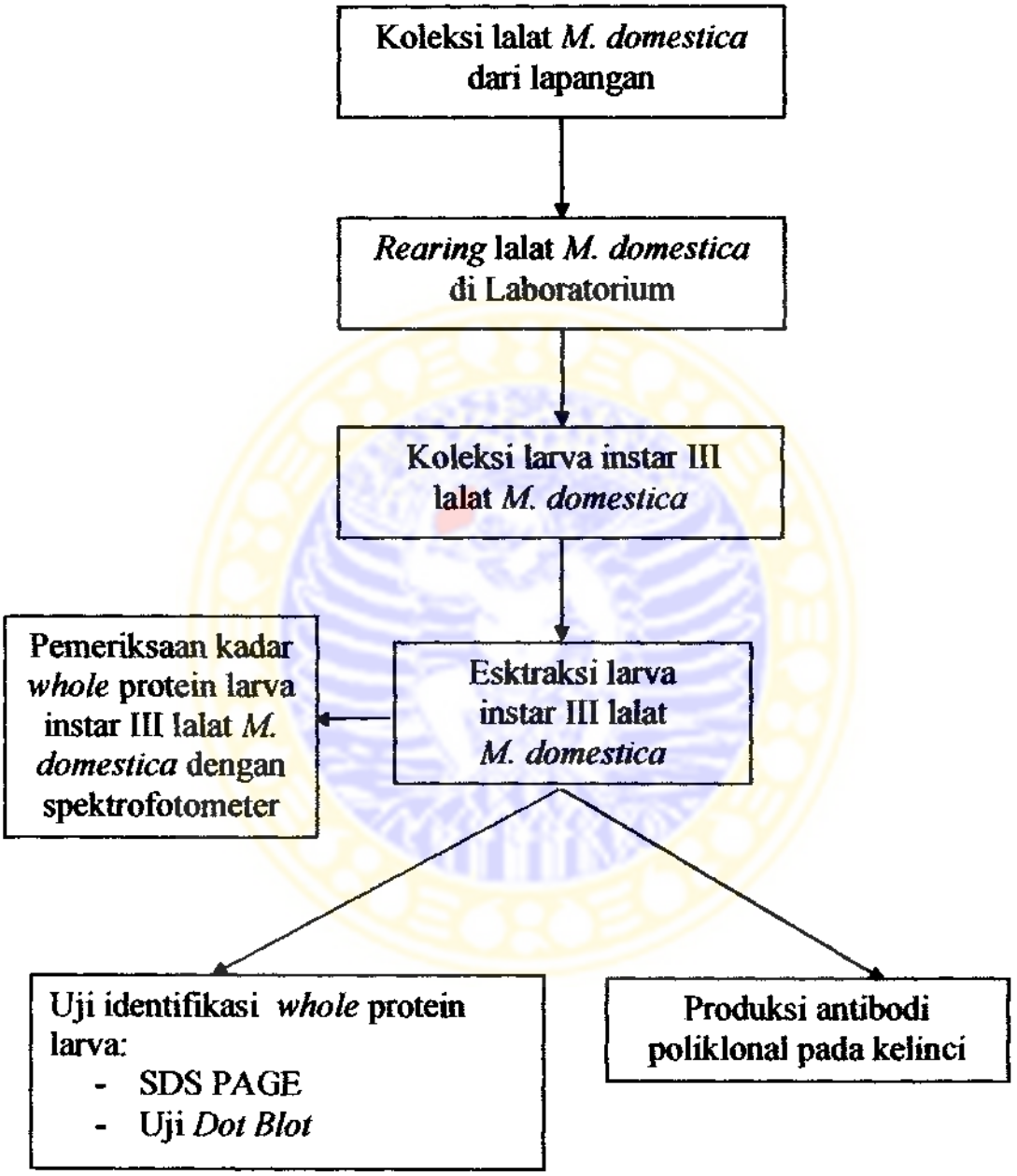
Turner, R.J. 1994. Imunnology A Comparative Approach. John Willey and Son's Ltd. Buffers Lane Chichester Mess Sussex PO1911UD Inc. USA. P203-206.

Vilk, W.A. 1992. Basic Microbiology 7th Ed. Harper Collins Publisher Inc. USA. P 267-277.

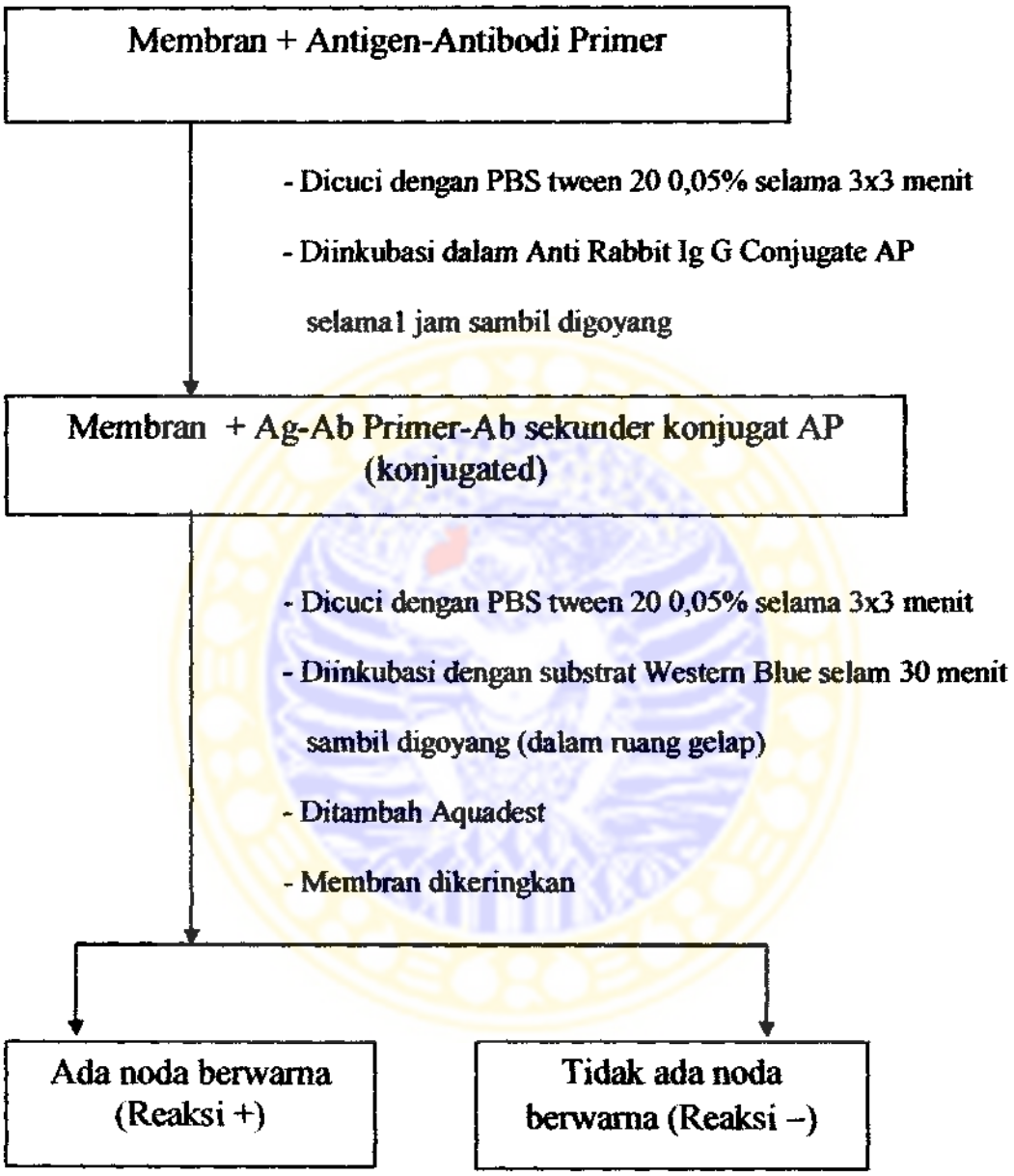
Wahab, A.S. dan S. Noerjati. 1993. Imunologi III. Gadjah Mada Press. Yogyakarta. Hal 45-49.

Wardhana, A.H., S. Muharsini dan Suhardono. 2003. Metode Pengawetan Larva dan Lalat Dewasa *Chrysomya bezziana* untuk Analisis DNA Mitokondria. J. Ilmu Ternak dan Vet. 8 : 264-275.

Lampiran. 1 **Diagram Alir Metode dan Operasional Penelitian**



Lampiran. 2 **Diagram Alir Uji *Dot Blot Whole* Protein Larva Instar III Lalat *M. domestica***



Lampiran 3. **Cara Kerja (Prosedur) *Dot Blot***

1. Siapkan kertas membran nitroselulose (NCM) ukuran 2x8 cm, buat petak 1x1 cm kemudian dibasahi dalam TBS (0,02 M Tris-HCl; 0,5 M NaCl; PH 7,5) selama 15 menit dan keringkan selama 5 menit.
2. Ambil antigen dari protein larva sebanyak 2 µl taruh dalam tabung eppendorf kemudian diencerkan dengan PBS 2^0-2^{-7} dan dari masing-masing tabung eppendorf ambil 2 µl teteskan pada petak-petak pada kolom I. Pada kolom II antigen tidak diencerkan.
3. Inkubasikan pada suhu ruang, kemudian cuci selama 3x5 menit dengan TBS Tween (TBS 0,05% Tween 20).
4. Blocking dengan 1% BSA dalam TBS tween 5%.
5. Inkubasi 1 jam dalam suhu ruang atau 24 jam pada suhu 4° C.
6. Cuci NCM dengan TBS tween 0,05% tiga kali, masing-masing selama 10 menit dengan shaker.
7. Potong membran nitroselulose pada kolom I sedangkan kolom II potong perpetak.
8. Pada kolom I ditambahkan antibodi primer dari serum kelinci dengan titer antibodi tertinggi (pemanenan serum kelinci pada booster ke-8) yang tidak diencerkan. Untuk (NCM) kolom II tambahkan antibodi primer dengan cara; buat pengenceran serum dengan buffer inkubasi (PBS) diencerkan 1/40, 1/80 sampai 1/5120.

9. Letakkan masing-masing petak NCM kolom II pada serum yang diencerkan.
10. Inkubasi pada suhu ruang dengan shaker selama satu jam.
11. Cuci NCM dengan TBS tween 0,05% tiga kali, masing-masing 10 menit dengan shaker.
12. Tambahkan antibodi sekunder (konjugat) dalam buffer inkubasi (PBS I).
13. Inkubasi dalam suhu ruang dengan shaker selama satu jam.
14. Cuci NCM dengan TBS tween 0,05% tiga kali, masing-masing 10 menit dengan shaker.
15. Tambahkan subtrat dan inkubasi pada suhu kamar di ruang gelap dengan penggoyangan sampai terlihat warna (hasil)
16. Stop reaksi dengan memindahkan NCM kedalam aquabidest non deionized.
17. Keringkan NCM pada suhu ruang dan hasil siap dianalisis. Peralatan dan bahan-bahan yang digunakan dalam uji *dot blot* dapat dilihat pada (Gambar 12 dan Gambar 13).

Lampiran 4. **Cara Kerja Teknik ELISA (Deteksi Antibodi)**

1. Mikroplate diisi dengan antigen (protein) dengan konsentrasi 10 µl/ml, masing-masing sumuran diisi 100 µl.
2. Inkubasi dalam waterbath suhu 37 °C semalam.
3. Cuci dengan buffer washing tiap sumuran 200 µl, sebanyak 3 kali.
4. Blocking dengan BSA (Cremer 4 %) dalam PBS I tiap sumuran 200 µl.
5. Inkubasi dalam waterbath suhu 37 °C selama 1 jam.
6. Cuci dengan buffer washing tiap sumuran 200 µl, sebanyak 3 kali.
7. Tanbahkan serum (sampel) sebanyak 100 µl tiap sumuran (pengenceran yang diinginkan). Larutan diencerkan dalam buffer inkubasi/PBS I.
8. Inkubasi dalam waterbath suhu 37 °C selama 1 jam.
9. Cuci dengan buffer washing tiap sumuran 200 µl, sebanyak 3 kali.
10. Tambahkan antibodi sekumder (conjugate) tiap sumuran 150 µl.
11. Inkubasi dalam waterbath pada suhu 37 °C selama 1 jam.
12. Cuci dengan buffer washing tiap sumuran 200 µl, sebanyak 3 kali.
13. tambahkan substrat tiap sumuran 150 µl.
14. Inkubasi dalam waterbath suhu 37 °C selama 5-15 menit sampai terlihat kuning.
15. Tambahkan larutan penyetop (NaOH 1 N) pada tiap sumuran sebanyak 50 µl.
16. Baca pada ELISA reader.

Lampiran 5. **Hasil ELISA Antibodi Poliklonal Protein Larva Instar III Lalat *M. domestica***

Tabel 2. Hasil ELISA Serum Protein Larva *M. domestica*

Model 680 Mikroplate Reader S/N 13998
Raw data report
27/09/2005 16:43:23
Lab. Name : Bio-Rad Laboratories
Kit name : End point # 01
Reading mode : Single
Measurement Filter : 415 nm (1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.027	0.028	0.030	0.029	0.033	0.029	0.031	0.033	0.027	0.028	0.031	0.029
B	0.024	0.848	1.295	2.010	1.845	1.814	1.443	1.622	1.415	2.018	0.104	0.024
C	0.037	0.541	1.026	1.408	1.330	1.616	1.538	2.195	1.681	1.704	0.096	0.029
D	0.027	0.444	0.678	1.055	1.699	1.574	1.527	1.922	1.719	1.097	0.095	0.210
E	0.031	0.628	0.785	1.201	1.877	1.067	1.355	1.013	1.495	1.648	0.101	0.024
F	0.029	0.371	0.525	1.131	1.242	1.140	1.274	1.338	0.918	1.429	0.090	0.031
G	0.027	0.277	0.438	0.853	1.671	0.177	1.276	1.104	0.943	1.248	0.090	0.034
H	0.029	0.042	0.030	0.026	0.029	0.025	0.026	0.031	0.026	0.028	0.027	0.029

Keterangan :

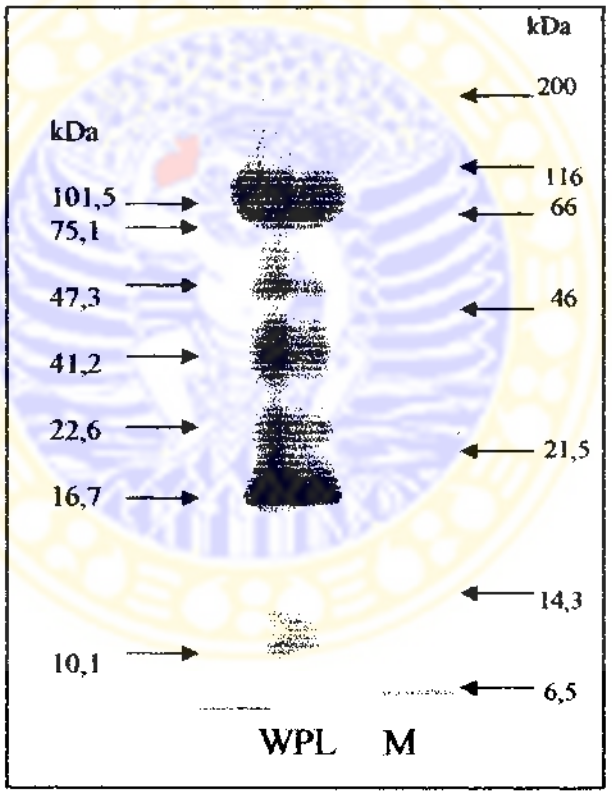
Kolom : 2 = kontrol
3 = booster 1
4 = booster 2
5 = booster 3
6 = booster 4
7 = booster 5
8 = booster 6
9 = booster 7
10 = booster 8
11 = booster 9

Kelinci 1 : B = Pengenceran 10
C = Pengenceran 20
D = Pengenceran 40

Kelinci 2 : E = Pengenceran 10
F = Pengenceran 20
G = Pengenceran 40

Lampiran. 6 **Hasil Fraksinasi Protein dengan SDS-PAGE 12%**

Hasil fraksinasi *whole* protein larva *M. domestica* dengan menggunakan SDS PAGE 12 %, berupa separasi molekul berdasarkan berat fraksi-fraksi protein yang tampak pada gel polyacrylamid. Dari perhitungan dengan membandingkan fraksi-fraksi protein dengan standart marker telah didapatkan 7 fraksi protein: 101,5 kDa, 75,1 kDa, 45,3 kDa, 41,2 kDa, 22,6 kDa, 16,7 kDa dan 10,1 kDa. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 10. Hasil Elektroforesis *Whole* Protein Larva *M. domestica* dengan SDS-PAGE 12% Pewarnaan Perak Nitrat ($AgNO_3$)

Keterangan : M = Marker ; WPL = *Whole* protein larva

Lampiran 7. **Cara Kerja (Prosedur) SDS PAGE 12 % (*Sodium Deodecyl Sulphonate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)**

Penentuan Berat Molekul dengan Elektroforesis SDS-PAGE 12 %

1. Siapkan semua bahan yang diperlukan :

Acrylamid	Tris HCL pH 8,8
Tris HCL pH 6,8	SDS 0,5 %
Aquadest	Temed
APS 10 % 4 °C	E. Buffer
Methanol 50 %	Asam Asetat 7,5 %
Glutaraldehid 10 %	NAOH 0,36 %
NH3	AgNo3
Formaldehid	Zitrnesoure 5 %
Butanol	

2. Membuat running gel

Bahan :	Acrylamid	2,5 ml
	Tris HCL pH 8,8	1,2 ml
	SDS 0,5 %	1, 2 ml
	Aquadest	1,1 ml
	Temed	5,0 ul
	APS 10 %	30 µl.

Cara Kerja : Masukkan lewat dinding kaca sampai 1 cm dari atas, tambahkan Butanol diatasnya sampai penuh. Fungsi Butanol adalah untuk meratakan permukaan running gel.

3. Membuat stacking gel.

Bahan : Acrylamid 0,66 ml

Tris HCL pH 6,8 0,8 ml

SDS 0,5 % 0,8 ml

Aquadest 0,8 ml.,

Temed 4,0 µl

APS 10 % 20 ul.

Cara Kerja : Masukkan keatas cetakan running gel sampai penuh kemudian masukkan comb ke stacking gel dan inkubasi selama 25 menit.

4. Siapkan sampel (Laemli buffer + sampel) masukkan ke dalam ependorf
5. Tutup ependorf ditusuk dengan jarum setengah tusukan, langsung direbus pada suhu 100 °C selama 5 menit.
6. Setelah inkubasi selesai lepaskan comb dan cuci dengan E buffer 1 kali.
7. Masukkan cetakan tadi ke Biometra, tuangi dengan E buffer 1 kali (kira-kira 800 ml). Hilangkan gelumbung pada lubang dengan cara menusukkan dengan jarum.
8. Masukkan sampel kedalam lubang comb. Pasang listrik dengan voltase 125 V dan 40 mA.
9. Tunggu sampai sampel turun seluruhnya.
10. Matikan listrik dan lepas gel pelan-pelan.
11. Tahap pencucian I :

- Metanol 25 ml Asam asetat 3,75 ml

Aquadest 72,25 ml goyang dengan kecepatan 42 x selama 30 menit.

Tahap pencucian II :

- Metanol 25 ml Asam Asetat 3,75 ml

Aquadest 93,75 ml goyang depan kecepatan 42 x selama 30 menit.

Tahap pencucian III : (Glutaraldehyd 10 %)

- Gutaraldehyd 10 ml

Aquadest 90 ml goyang dengan kecepatan 42 x selama 30 menit.

Tahap pencucian IV :

- Pencucian dengan aquadest @ 100 ml 3 kali selama 30 menit.

12. Tahap pewarnaan :

Timbang AgNo3 0.8 g + 4 ml DW, campur dan masukkan kedalam larutan yang terdiri dari : NaOH 0,36 % 21 ml., NH3 1,4 ml, Aquadest 73,5 ml. masukkan dalam petridish dan goyang dengan kecepatan 42 kali selama 15 menit.atau dalam Commasie Brilliant Blue R-250 Biorad

13. Cuci dengan Aquadest @ 100 ml 2 kali selama 2 menit.

14. Masukkan pengembang warna yang terdiri dari :

- Formaldehyd 3,7 % 50 ul

Zitronensaure 5 % 100 ul

Aquadest 100 ml

tunggu 5 menit sambil goyang terus.

15. Masukkan stop reaksi dengan Acetic Acid 10 %

16. Cuci dengan aquadest @ 100 ml 2 kali selama 2 menit

17. Beri Gliserol 10 % (Gliserin 10 ml + Aquadest 90 ml)

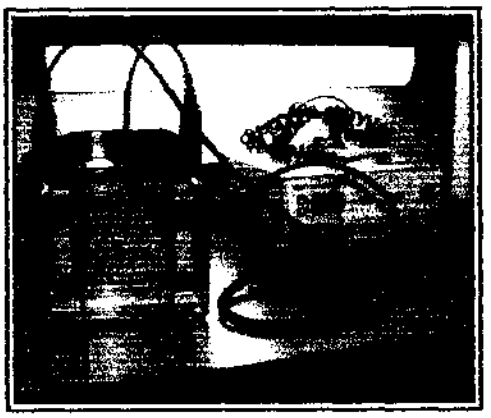
Penentuan berat molekul. Dengan membandingkan hasil elektroforesis sampel dengan marker protein. Penetuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai Rf (Retardation factor) dari masing-masing pita dimana :

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat sampel}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

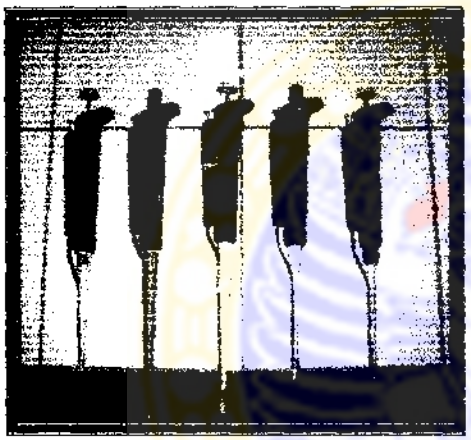
Massa molekul relatif ditentukan dengan cara mengkonversikan data nilai Rf dan massa molekul relatif dari protein standar yang mempunyai persamaan yaitu :

Y = 0,8943 X2 – 1,8784 X + 2,3239, X adalah nilai Rf, sedangkan Y adalah logaritma massa molekul relatif (log Mr) protein standar. Nilai Rf dinyatakan sebagai nilai X (variabel bebas) dan nilai log berat molekul atau log marker dalam satuan Dalton (Da) dinyatakan sebagai nilai Y (variabel terikat), kemudian mencari persamaan regresi yang sesuai. Setelah persamaan regresi didapat, nilai X(Rf) sampel dimasukkan kedalam persamaan untuk mendapatkan nilai berat molekul protein sampel. Kemudian dibuat kurva standar dengan harga Rf srbagai sumbu x dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu y. Berat molekul sampel ditentukan dengan diinterpolasikan pada kurva standar dari protein marker.

Gambar 10. Pengambilan darah kelinci



Gambar 11. Proses *Running*



Gambar 12. Peralatan (Mikropipet)

Gambar 13. Bahan Uji *Dot Blot*

antigen dan melepas antigen sedikit demi sedikit sehingga memperpanjang pemaparan antigen dengan sistem immun dan memacu sistem immun dengan afinitas tinggi (Baratawijaya, 2002). Salah satu *adjuvant* yang sering digunakan adalah *Freund's Complete Adjuvant* dan *Freund's Incomplete Adjuvant* yang digunakan sebagai *booster*. *Freund's Adjuvant* terdiri atas campuran minyak mineral dan pengemulsi dengan mikobakteria (FCA) atau tanpa mikobakteria (FIA) (Smith, 1995).

Kehadiran minyak mendorong terjadinya granuloma di sekitar tempat penyuntikan, antigen dilepaskan perlahan-lahan dari fase air dalam emulsi sehingga terbentuk suatu depot. Bagian aktif dari mikobakteria (FCA) adalah muramil dipeptida akan meningkatkan aktivitas tersebut di atas (Tizard, 1988).

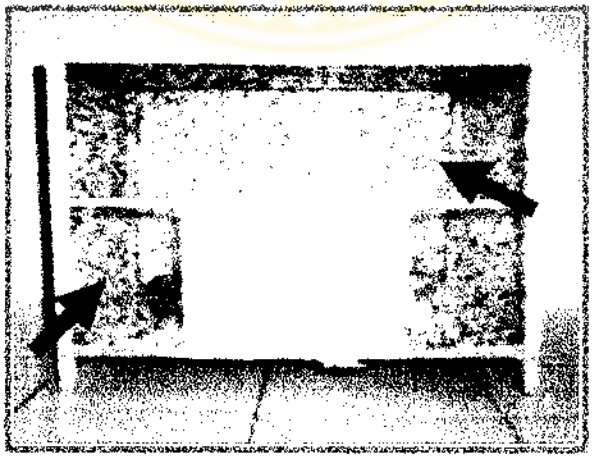
Menurut Smith (1995), dosis antigen yang dianjurkan untuk immunisasi awal antara satu sampai sepuluh miligram. Dosis antigen yang lebih rendah akan menghasilkan antibodi dengan afiditas lebih tinggi daripada dosis antigen yang lebih tinggi. Jika dosis pada immunisasi pertama diberikan dengan *Freund's Complete Adjuvant* (FCA), maka pada immunisasi ulang (*Booster*) diberikan dalam *Freund's Incomplete Adjuvant* (FIA) untuk menghindari reaksi hipersensitivitas yang hebat pada hewan coba.

2.7 Metode *Dot Blot*

Imunobloting biasanya digunakan untuk menentukan kadar relatif dari protein dalam suatu campuran berbagai jenis protein atau lainnya sehingga protein dapat dideteksi dengan menggunakan probe antibodi yang sesuai (Kresna, 2001).

3.3.1 *Rearing* Lalat dan Koleksi Larva Instar III Lalat *M. domestica*

Lalat dewasa jantan dan betina diletakkan dalam kurungan lalat (kasa) berukuran 40x40x40 cm, penelitian ini dilakukan dengan menggunakan populasi laboratorium di mana perkembangbiakan dalam satu generasi secara lengkap di dalam laboratorium (Gambar 6). Lalat jantan dan betina diletakkan dalam kurungan lalat agar dapat melakukan perkawinan secara alam. Lalat dewasa akan diberi pakan dengan diberi buah-buahan, air dan gula *ad libitum* yang telah disiapkan hingga terjadi perkawinan dan lalat betina yang gravid siap untuk meletakkan telur. Telur diletakkan pada malam hari pada perangkat peletakan telur yang telah disiapkan di kandang. Telur yang dihasilkan dipisahkan dalam tempat tersendiri. Telur yang telah menetas menjadi larva instar I dipisahkan dan diletakkan dalam wadah tersendiri, pada tempat tersebut disediakan juga makanan untuk larva. Setelah menjadi larva instar III kemudian dikoleksi dalam tabung dan disimpan dalam refrigerator dengan suhu 4 °C. Larva tersebut nantinya akan digunakan untuk mensuplai bahan-bahan pada percobaan vaksinasi.



Gambar 6. Kandang "*Rearing*" Lalat *M. domestica*
Keterangan: Panah merah (↑)